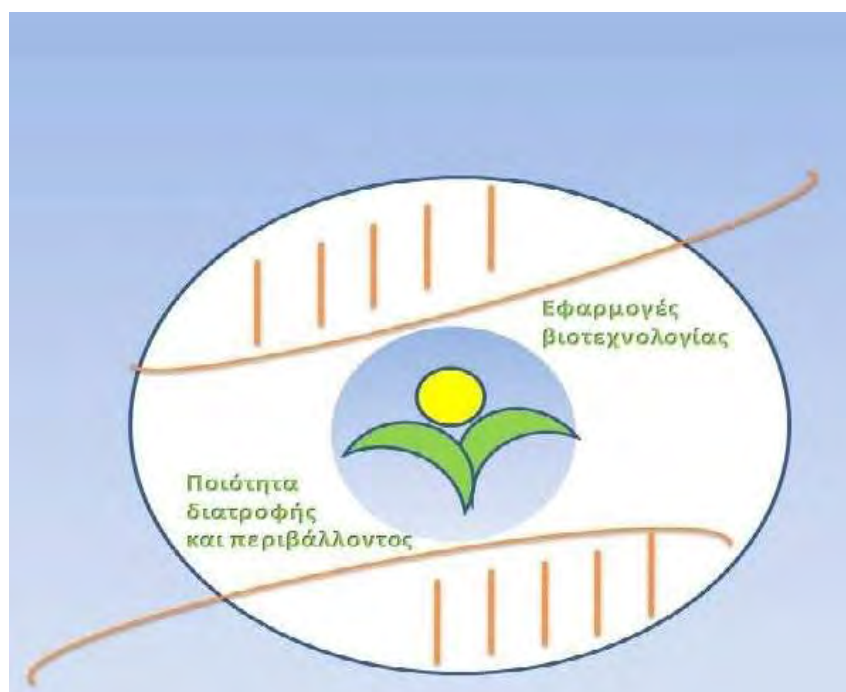




**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**  
**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**  
**ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

**ΑΝΤΡΙΑ ΘΕΟΔΟΣΗ**

**ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΕΝΩΣΕΩΝ ΦΥΤΙΚΗΣ  
ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΣΕ EX VIVO ΣΥΣΤΗΜΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ**



**Σεπτέμβριος, 2019**

**Αξιολόγηση της βιολογικής δράσης ενώσεων φυτικής προέλευσης σε  
ex vivo σύστημα κυττάρων**

**Evaluation of the biological activity of plant origin compounds in an  
ex vivo cell system**

#### **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**Επιβλέπων: Ψαρρά Άννα-Μαρία, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας, τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας**

**Μπαλατσός Νικόλαος: Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας**

**Σκαμνάκη Βασιλική, Λέκτορας Βιοχημείας-Μεταβολισμού, τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας**

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ένας μεγάλος αριθμός *in vitro* και *in vivo* ερευνών των τελευταίων χρόνων έχουν αποδείξει και τεκμηριώσει τον καθοριστικό και συνάμα ευεργετικό ρόλο που μπορεί να διαδραματίσει η Μαστίχα Χίου στην ζωή μας. Τα τριτερπένια αντιπροσωπεύουν το μεγαλύτερο μέρος του εκχυλίσματος της μαστίχας και σε αυτά είναι που αποδίδονται κυρίως τα οφέλη της. Τα τριτερπένια ομοιάζουν δομικά με τα γλυκοκορτικοειδή για το λόγο αυτό τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει μελέτες σε αυτά για το κατά πόσο μπορούν να δρουν ως τροποποιητές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών. Ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών (GR) στην ανενεργή του μορφή βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα. Όταν συνδέονται σε αυτόν τα γλυκοκορτικοειδή προκαλούν την ενεργοποίηση και την πυρηνική του μετατόπιση με αποτέλεσμα να έχει την ικανότητα να προσδένεται ειδικά με το DNA και να ελέγχει την έκφραση των γονιδίων στόχων του. Η παρούσα διπλωματική εργασία είχε σκοπό την μελέτη και τον χαρακτηρισμό των αντικαρκινικών, αντιυπεργλυκαιμικών και αντιφλεγμονωδών δράσεων εκχυλίσματος από τα φύλλα του μαστιχόδεντρου καθώς και τη Μαστίχα Χίου, τη διερεύνηση των βιοχημικών μηχανισμών επίτευξης αυτών καθώς και της εμπλοκής τους στη σηματοδότηση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών. Αρχικά ελέγξαμε τον τρόπο με τον οποίο δρα το εκχύλισμα από τα φύλλα του μαστιχόδεντρου μέσω της ανάλυσης ανοσοαποτύπωσης κατά Western στη κυτταρική σειρά Hek293 (human embryonic kidney cells), όπου παρατηρήθηκε μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του GR, παρουσία δεξαμεθαζόνης, καθώς και του γλυκονεογενετικού ενζύμου PECK, που αποτελεί γονίδιο στόχο του GR. Όσο αφορά την μελέτη της αποπτωτικής δράσης παρατήθηκε μείωση στα πρωτεϊνικά επίπεδα της προαποπτωτικής πρωτεΐνης procaspase 3, παρουσία αυξανόμενης συγκέντρωσης του εκχυλίσματος. Στη κυτταρική σειρά HeLa, παρατηρήθηκε αύξηση στον υποδοχέα GR διαπιστώθηκε αυξανόμενη συγκέντρωση εκτός από στα 50μg+dex όπου σημειώθηκε μείωση κάτι που χρήζει επανάληψη για να σιγουρευτούμε για το αποτέλεσμα αυτό, παρατηρήθηκε όμως μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της p65 υπομονάδας του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB, φανερώνοντας την αντιφλεγμονώδη δράση του εκχυλίσματος μας. Στην συνέχεια του πειράματος μας, μελετήσαμε εκχύλισμα από την ρητίνη (Μαστίχα Χίου) σε κύτταρα Hek293, όπου κι εδώ διακρίναμε τη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, ενώ όσο αφορά την PECK παρατηρήθηκε μείωση μόνο στα 20μg/ml. Τέλος, πραγματοποιήθηκε μελέτη των πρωτεϊνικών επιπέδων της προκασπάσης 3 και BCL-2, όπου φάνηκε και πάλι το εκχύλισμα από τη Μαστίχα Χίου να προκαλεί μείωση των πρωτεϊνικών τους επιπέδων. Επομένως, από τα αποτελέσματά μας αναδείχθηκαν οι αντι-υπεργλυκαιμικές, αντιφλεγμονώδεις και αποπτωτικές δράσεις των εκχυλισμάτων από τα φύλλα και τη ρητίνη του μαστιχόδεντρου, καθιστώντας τα μελλοντικά αξιοποιήσιμα για την ανάπτυξη νέων φαρμάκων, ενώ μένει να αποσαφηνιστεί περαιτέρω και η εμπλοκή τους στη σηματοδότηση του GR.

## ABSTRACT

A numerous of recent in vitro and in vivo studies have demonstrated and documented the decisive and beneficial role that Chios Mastic can play in our lives. Triterpenes represent the bulk of the mastic extract and it is these that are mainly attributed to its benefits. Triterpenes are structurally similar to glucocorticoids, so in recent years studies have been done on whether they can act as glucocorticoid receptor modifiers. The glucocorticoid receptor (GR) in its inactive form is found in the cytoplasm. When attached to it, glucocorticoids induce its activation and nuclear translocation, resulting in the ability to bind specifically to DNA and to control the expression of its target genes. The present study aimed to study and characterize the anti-cancerous, antihyperglycemic and anti-inflammatory effects of extracts from mastic tree leaves as well as Chios mastic, investigating their biochemical mechanisms of action and their involvement in glycoside receptor signaling. Firstly, we tested how the extract from mastic tree leaves acts by Western blotting analysis of the Hek293 cell line (human embryonic kidney cells), where a decrease in GR protein levels was observed in the presence of dexamethasone and gluconeogenic enzyme PEPCK, which is a target gene of GR. In the study of apoptotic activity, a decrease in the protein levels of the pro-apoptotic protein procaspase 3 was observed, in the presence of increasing concentration of the extract. In the HeLa cell line, an increase in the GR receptor was observed with increasing concentrations except at 50µg + dex where a decrease was observed which required a repeat to be assured of this effect, but a decrease in the protein levels of the p65 subunit of the NF-κB transcription factor was observed, revealing the anti-inflammatory action of our extract. Following our experiment, we studied an extract of resin (Chios Mastic) on Hek293 cells, here we still observed a decrease in glucocorticoid receptor protein levels, whereas for PECK only a decrease of 20 µg / ml was observed. Finally, a study of the protein levels of Procaspase 3 and BCL-2 was performed, where again the extract from Chios Mastiha showed a decrease in their protein levels. Therefore, our results highlighted the anti-hyperglycemic, anti-inflammatory and apoptotic effects of leaf extract and mastic tree resin, making them useful in the future for the development of new drugs, while further clarifying their implications.

## ΠΕΡΙΟΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
ABSTARCT.....	5
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1. Η ΜΑΣΤΙΧΑ ΧΙΟΥ.....	9
1.1.1. Η ΜΑΣΤΙΧΑ ΧΙΟΥ ΚΑΙ ΟΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΗΣ ΔΡΑΣΕΙΣ.....	9
1.1.2. ΑΝΤΙΦΛΕΓΜΟΝΩΔΕΙΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ.....	10
1.1.3. ΚΑΡΔΙΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ.....	11
1.1.4. ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ.....	11
1.1.5. ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΤΗΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΛΙΠΙΔΙΩΝ.....	12
1.2 ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΗ.....	13
1.2.1. ΓΕΝΙΚΑ.....	13
1.2.2. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ.....	14
1.2.3. ΠΑΡΕΝΕΡΓΕΙΕΣ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ.....	15
1.3. Ο ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ(GR).....	15
1.3.1. ΓΕΝΙΚΑ.....	15
1.3.2. ΔΟΜΙΚΕΣ ΕΠΙΚΡΑΤΕΙΕΣ ΤΟΥ GR.....	15
1.3.3. ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΑ ΜΕΤΑΓΡΑΦΑ ΤΟΥ GR.....	16
1.3.4. ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΟΤΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΤΟΥ GR.....	18
1.4. ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ ΚΑΙ ΤΟΥ GR ΣΤΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ.....	20
1.4.1 ΑΝΤΙΦΛΕΓΜΟΝΩΔΕΙΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ GR.....	20
1.4.2. ΠΡΟ-ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ GR.....	20
1.4.3. ΑΝΤΙ-ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ GR.....	22
1.5. ΠΩΣ ΜΕΣΟΛΑΒΕΙ Η ΜΑΣΤΙΧΑ ΧΙΟΥ ΣΤΗ ΣΥΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ ΤΟΥ GR ΚΑΙ ΠΟΙΑ ΕΙΝΑΙ Η ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΗΣ.....	22
1.6. ΣΚΟΠΟΣ.....	23
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	23

<b>2.1. ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ .....</b>	<b>23</b>
<b>2.2. ΥΛΙΚΑ.....</b>	<b>24</b>
<b>2.2.1. ΧΗΜΙΚΑ.....</b>	<b>24</b>
<b>2.2.2. ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΜΑΣΤΙΧΑΣ ΧΙΟΥ.....</b>	<b>25</b>
<b>2.2.3. ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ.....</b>	<b>26</b>
<b>2.2.4. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ.....</b>	<b>27</b>
<b>2.2.5. ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ.....</b>	<b>27</b>
<b>2.2.6. ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ.....</b>	<b>27</b>
<b>2.3. ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>28</b>
<b>2.3.1. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....</b>	<b>28</b>
<b>2.3.2. ΛΥΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....</b>	<b>28</b>
<b>2.3.3. ΜΕΘΟΔΟΣ BRADFORD.....</b>	<b>28</b>
<b>2.3.4. SDS-PAGE.....</b>	<b>29</b>
<b>2.3.5. ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΤΗΣ WESTERN.....</b>	<b>29</b>
<b>2.3.6. ΕΠΕΞΑΡΓΑΣΙΑ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΚΑΙ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....</b>	<b>30</b>
<b>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>30</b>
<b>3.1 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΡΑΣΕΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΤΑ ΦΥΛΛΑ ΤΟΥ ΜΑΣΤΙΧΟΔΕΝΤΡΟΥ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ HEK293.....</b>	<b>30</b>
<b>3.1.1. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΤΑ ΦΥΛΛΑ ΤΟΥ ΜΑΣΤΙΧΟΔΕΝΤΡΟΥ ΣΤΙΣ ΓΛΥΚΟΝΕΟΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ GR.....</b>	<b>30</b>
<b>3.1.2. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΤΗΣ ΠΡΟ-ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΤΑ ΦΥΛΛΑ ΤΟΥ ΜΑΣΤΙΧΟΔΕΝΤΡΟΥ.....</b>	<b>32</b>
<b>3.2 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΡΑΣΕΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΤΑ ΦΥΛΛΑ ΤΟΥ ΜΑΣΤΙΧΟΔΕΝΤΡΟΥ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ HeLa.....</b>	<b>32</b>
<b>3.2.1. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΤΑ ΦΥΛΛΑ ΤΟΥ ΜΑΣΤΙΧΟΔΕΝΤΡΟΥ ΣΤΙΣ ΓΛΥΚΟΝΕΟΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ GR.....</b>	<b>32</b>
<b>3.2.2. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΦΛΕΜΟΝΩΔΟΥΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΤΑ ΦΥΛΛΑ ΤΟΥ ΜΑΣΤΙΧΟΔΕΝΤΡΟΥ.....</b>	<b>33</b>

3.2.3. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΤΗΣ ΠΡΟ-ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΤΑ ΦΥΛΛΑ ΤΟΥ ΜΑΣΤΙΧΟΔΕΝΤΡΟΥ.....	34
3.3 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΩΝ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΡΑΣΕΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΤΗ ΜΑΣΤΙΧΑ ΧΙΟΥ (ΡΗΤΙΝΗ) ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ HEK293.....	35
3.3.1. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΤΗ ΜΑΣΤΙΧΑ ΧΙΟΥ ΣΤΙΣ ΓΛΥΚΟΝΕΟΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ GR.....	35
3.3.2 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΠΡΟ ΚΑΙ ΑΝΤΙ ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΜΑΣΤΙΧΑ ΧΙΟΥ.....	36
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	37
5.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	41



## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1. Η ΜΑΣΤΙΧΑ ΧΙΟΥ

#### 1.1.1. Η ΜΑΣΤΙΧΑ ΧΙΟΥ ΚΑΙ ΟΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΗΣ ΔΡΑΣΕΙΣ

Η Μαστίχα Χίου ανήκει στην οικογένεια Anacardiaceae του γένους *Pistacia lentiscus* L. και φύεται κατά κύριο λόγο στις ακτές της Ανατολικής λεκάνης της Μεσογείου και αποτελεί τη ρητινώδη έκκριση του μαστιχόδεντρου. Η ποικιλία *Pistacia Lentiscus* var *Chia* που παράγεται αποκλειστικά νότια του νησιού της Χίου είναι αυτή που δίνει την εκλεκτή γεμάτη θεραπευτικές ιδιότητες Μαστίχα. Από τον κορμό και τα μεγάλα κλαδιά εκκρίνεται η φυσική και αρωματική ρητίνη σε σχήμα δακρύων, μέσω επιφανειακών τομών. Παραμένει κάτω από το θάμνο μέχρι να στερεοποιηθεί, κι έπειτα οι μαστιχοπαραγωγοί την συλλέγουν, την διαχωρίζουν σε κατηγορίες και την καθαρίζουν, προτού παραδοθεί στο συνεταιρισμό κάθε χωριού για προωθηθεί στη συνέχεια στην Ένωση Μαστιχοπαραγωγών Χίου. (Chios Mastiha published scientific booklet 2018)

Ποια ακριβώς είναι τα συστατικά της Μαστίχας Χίου δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί. Κάποια από τα αρωματικά και θεραπευτικά της συστατικά που έχουν βρεθεί στην ρητίνη είναι φυσικά πολυμερή, πτητικά και αρωματικά συστατικά που συνθέτουν το αιθέριο έλαιο (μαστιχέλαιο), τερπενικά οξέα, φυτοστερόλες, πολυφαινολικά μόρια κι ένας μεγάλος αριθμός από άλλα δραστικά συστατικά, μερικά από τα οποία απαντώνται στη φύση για πρώτη φορά. Λόγω αυτών των συστατικών, εξηγείται και η χρήση της Μαστίχας Χίου σε διάφορους τομείς όπως στην υγεία, τα τρόφιμα και στην προσωπική περιποίηση. Πλήθος ερευνών τα τελευταία χρόνια έχουν δείξει τις ευεργετικές δράσεις της Μαστίχας Χίου, όπως Δράσεις αντιμικροβιακές, αντιφλεγμονώδεις, αντιοξειδωτικές, αντικαρκινικές. Έχει βρεθεί ότι η Μαστίχα Χίου δρα αποτελεσματικά κατά των παθήσεων του πεπτικού συστήματος, ενώ ταυτόχρονα συμβάλλει στην επούλωση τραυμάτων και την ανάπτυξη της επιδερμίδας. (Chios Mastiha published scientific booklet)



Εικόνα 1: Το μαστιχόδεντρο *Pistacia Lentiscus* var *Chia*



**Εικόνα 2: Η Μαστίχα Χίου.**

*Η Μαστίχα Χίου (ρητίνη) εκκρίνεται σε σχήμα δακρύων από τον κορμό και τα μεγάλα κλαδιά του μαστιχόδεντρου *Pistacia Lentiscus* var *Chia*, μέσω επιφανειακών τομών, παραμένει κάτω από το θάμνο μέχρι να στερεοποιηθεί, κι έπειτα συλλέγεται, διαχωρίζεται σε κατηγορίες και καθαρίζεται από τους μαστιχοπαραγωγούς. (Chios Mastiha published scientific booklet)*

### **1.1.2 ΑΝΤΙΦΛΕΓΜΟΝΩΔΕΙΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ**

Τα τελευταία χρόνια, υπήρξε ένα συνεχές αυξανόμενο ενδιαφέρον για την Μαστίχα Χίου, λόγω των αντιοξειδωτικών και αντιφλεγμονωδών αποτελεσμάτων της. Πρόσφατα, εξετάστηκε αν η Μαστίχα Χίου μπορεί να επηρεάσει τη λειτουργία ενεργοποιημένων μακροφάγων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τόσο η στερεή όσο και η υγρή Μαστίχα Χίου ανέστειλε την παραγωγή προ-φλεγμονωδών μορίων, όπως μονοξειδίου του αζώτου (NO) και προσταγλαδίνη (PGE2) σε μακροφαγικά κύτταρα RAW 264.7, ενεργοποιημένα από λιποπολυσακχαρίδιο (LPS). Επίσης, έχει δείχθει η μείωση τόσο των μεταγραφικών όσο και των πρωτεϊνικών επιπέδων της συνθάσης του NO (iNOS), καθώς και της κυκλοοξυγενάσης 2 (COX-2), ενός ενζύμου υπεύθυνο για το σχηματισμό προσταγλαδινών και την επακόλουθη επαγωγή φλεγμονής. Επίσης, η Μαστίχα ανέστειλε την πρωτεϊνική κινάση C, η οποία εξασθενεί την παραγωγή H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> από NADPH οξειδάσες, ένα αντιοξειδωτικό χαρακτηριστικό το οποίο μπορεί να έχει άμεση επίπτωση στις αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες της υπό μελέτη ένωσης. Λόγω των αντιφλεγμονωδών ιδιοτήτων της, η Μαστίχα Χίου έχει, ακόμη, χρησιμοποιηθεί για να μειώσει ή να βελτιώσει τα συμπτώματα σε ανθρώπους που πάσχουν από αυτοάνοσες ασθένειες, όπως η νόσος Crohn. Συγκεκριμένα, χορήγηση του εκχυλίσματος της Μαστίχας Χίου σε ασθενείς με τη νόσο του Crohn, οδήγησε σε μείωση του TNF-α (tumor necrosis factor) και σημαντική αύξηση του MIF (migrating inhibitory factor) από δείγμα περιφερικού αίματος, υποδηλώνοντας ότι αναστέλλεται η μετανάστευση και χημειοταξία των μακροφάγων. Επιπροσθέτως, Διερευνήθηκαν οι αντιφλεγμονώδεις επιδράσεις της Μαστίχας, από τα φύλλα του μαστιχόδεντρου *Pistacia lentiscus*, σε ποντίκια με αλλεργικό άσθμα αναστέλλει σημαντικά τα ηωσινοφιλικά κύτταρα καταστέλλοντας την παραγωγή φλεγμονωδών κυτοκινών (IL-5 και IL-13), καθώς και χημειοκινών στο

υγρό των βρογχοκυψελίδων.. Σε άλλα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν παρουσιάζει ενδιαφέρον το γεγονός ότι το τριτερπενοειδές κλάσμα της ρητίνης έδειξε αξιοσημείωτη αύξηση της ενδοκυτταρικής γλουταθειόνης. Τα αποτελέσματα περιλαμβάνουν ισχυρή ένδειξη της α δραστικότητας της ρητίνης (Μαστίχας Χίου). Επομένως, τα πειραματικά αυτά δεδομένα, στο σύνολό τους αποκαλύπτουν τις σημαντικές αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις δράσεις της Μαστίχας Χίου, τόσο από in vitro όσο και από κλινικές δοκιμές. (Dimas et al. 2012;Chios Mastiha published scientific booklet)

### **1.1.3. ΚΑΡΔΙΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ**

Εκτός από τις αναμφισβήτητες αντιφλεγμονώδεις δράσεις της Μαστίχας Χίου, μελέτες έφεραν στο φως και καρδιοπροστατευτικές δράσεις της στο καρδιαγγειακό σύστημα μειώνοντας αποτελεσματικά τα επίπεδα χοληστερόλης στον ορό και της οξείδωσης της LDL σε ανθρώπους. Επίσης, έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε κύτταρα HAECs (human aortic endothelial cells) έδειξε ότι το εκχύλισμα της Μαστίχας Χίου ανέστειλε σημαντικά την έκφραση μορίων προσκόλλησης, όπως VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) και ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) που παίζουν σημαντικό ρόλο στη δημιουργία αθηροσκλήρυνσης, αποκαλύπτοντας τις καρδιοπροστατευτικές και αντιοξειδωτικές δράσεις της Μαστίχας Χίου. επίσης, η Μαστίχα ανέστειλε σημαντικά τη δέσμευση λευχαιμικών κυττάρων U937 διεγερόμενα από TNF-α (tumor necrosis factor) και εξασθένησαν τη φωσφορυλίωση της p65 υπομονάδας του NF-κB. Συνοψίζοντας, με την παρούσα έρευνα διευρύνθηκαν τα υπάρχοντα δεδομένα σχετικά με την καρδιοπροστατευτική επίδραση της Μαστίχας Χίου, παρέχοντας μια νέα εικόνα όσο αφορά τους μηχανισμούς που είναι υπεύθυνοι για τη θετική επίδραση της Μαστίχας Χίου στην ενδοθηλιακή λειτουργία, γεγονός που μπορεί να βοηθήσει στο σχεδιασμό μιας πιθανής νέας θεραπείας στην αθηροσκλήρωση. (Dimas et al. 2012) (Chios Mastiha published scientific booklet)

### **1.1.4. ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ**

Ακόμη, πολλές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί αφορούν την αντικαρκινική ιδιότητα της Μαστίχας Χίου. Συγκεκριμένα, το εκχύλισμα της Μαστίχας Χίου ανέστειλε την ανάπτυξη ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων προστάτη PC-3, μπλοκάροντας την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, σταματώντας τα κύτταρα στη φάση G1 και μειώνοντας τα πρωτεϊνικά επίπεδα της κυκλίνης D1 και της p-AKT κινάσης (Dimas et al., 2012). Ακόμη, μια άλλη έρευνα έδειξε ότι το έλαιο Μαστίχας Χίου μείωσε τον αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα και την απελευθέρωση χημειοκίνης από κύτταρα πνευμονικού καρκινώματος. Επίσης, η θεραπεία με Μαστίχα Χίου σε κύτταρα ανθρώπινου οστεοσαρκώματος οδήγησε σε μια εξαρτώμενη από τη δόση και το χρόνο

μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων, μια δόσοεξαρτώμενη αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης και του κυτταρικού θανάτου λόγω απόπτωσης. Περαιτέρω εξέταση των κυττάρων αποκάλυψε στοιχεία έναρξης του αποπτωτικού μηχανισμού και διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1. Ειδικότερα, αποδείχθηκε ότι η Μαστίχα Χίου προκαλεί διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1, μέσω της ρύθμισης πρωτεϊνών που σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο και απόπτωση μέσω ενεργοποίησης κασπασών σε ανθρώπινα κύτταρα οστεοσαρκώματος, θεωρώντας την ως νέα θεραπευτική προσέγγιση για το ανθρώπινο οστεοσάρκωμα (Min et al, 2009). Τέλος, πειράματα που διεξήχθησαν σε καρκινικά κύτταρα πνεύμονα Lewis (Lewis lung carcinoma) καθώς και σε ποντικούς μεταμοσχευμένους με τα συγκεκριμένα κύτταρα, έδειξαν ότι το έλαιο από Μαστίχα Χίου εξασθενεί την ανάπτυξη όγκου και ασκεί επαγωγή της απόπτωση στα κύτταρα όγκου, αναστέλλει τη φλεγμονώδη απόκριση που συνδέεται με τον όγκο καθώς και την αγγειογένεση, μέσω αναστολής της σηματοδότησης των Ras/RhoA καθώς και του NF-κβ (Magkoutas et al., 2009).

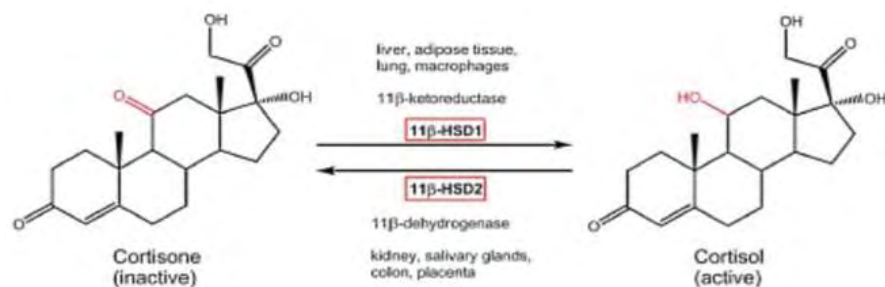
#### **1.1.5 ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΤΗΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΛΙΠΙΔΙΩΝ**

Οι πολλαπλές ευεργετικές δράσεις της Μαστίχας Χίου δεν τελειώνουν εδώ, αλλά μελέτες έχουν γίνει και για το πώς η Μαστίχα Χίου επιδρά στο μεταβολισμό της γλυκόζης και των λιπιδίων. Έρευνες έχουν δείξει ότι η Μαστίχα Χίου δρα ευεργετικά στην υπεργλυκαιμία. Ορισμένα συστατικά της που σχετίζονται με αυτές τις δράσεις, είναι το ολεανοϊκό οξύ και ορισμένες ενώσεις τριτερπενοειδών. Επίσης, πραγματοποιήθηκαν in vivo δοκιμές που έδειξαν σημαντικές μειώσεις της γλυκόζης στο αίμα, παρουσιάζοντας σημαντική αντιδιαβητική δραστηριότητα. Επιπλέον, μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε διαβητικά ποντίκια έδειξαν μείωση των επιπέδων τριγλυκεριδίων, LDL, HDL και γλυκόζης του ορού, ενώ μειώθηκε κατά πολύ και η ηπατική στεάτωση (Georgiadis et al., 2013). Σε ασθενείς που τους χορηγούσαν καθημερινά Μαστίχα Χίου, σημειώθηκε μείωση των επιπέδων της ολικής χοληστερόλης ορού, της LDL, της απολιποπρωτεΐνης A-1 και B (Tzani, Bletsas, et al., 2016). Έχει διακριβωθεί ότι αυτές οι δράσεις μεσολαβούνται μέσω τροποποίησης της σηματοδότησης των υποδοχέων PPARα και PPARγ (peroxisome proliferator-activated receptor alpha και gamma).. Γενικά, οι έρευνες που έχουν γίνει δείχνουν ότι συστατικά της Μαστίχας Χίου αποτελούν αγωνιστές των PPARs (Georgiadis et al., 2014). Απαιτούνται ωστόσο επιπλέον έρευνες για να αποσαφηνιστούν εντελώς οι μηχανισμοί με τους οποίους επιδρά.

#### **1.2 ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΗ**

### 1.2.1. ΓΕΝΙΚΑ

Τα γλυκοκορτικοειδή αποτελούν στεροειδείς ορμόνες και τα πλέον διαδεδομένα φάρμακα σε όλο τον κόσμο. Αυτό οφείλεται στην δράση που ασκούν μέσω του υποδοχέα τους GR (Glycocorticoid Receptor), με αποτέλεσμα ισχυρές αντιφλεγμονώδεις και ανοσοκατασταλτικές επιδράσεις. Τα φυσικά γλυκοκορτικοειδή προέρχονται από την χοληστερόλη, είναι λιπόφιλα μόρια, έχοντας την ικανότητα να διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες με απλή διάχυση, με πιο γνωστό φυσικό γλυκοκορτικοειδές στον άνθρωπο τη κορτιζόλη. Οι συνδεόμενες με κορτικοστεροειδή σφαιρίνες του ορού (corticosteroid binding globulin) και η εκφραζόμενη 11β-αφυδρογόναση των υδροξυστεροειδών (11β- hydroxysteroid dehydrogenase) είναι υπεύθυνες για την διαθεσιμότητα των γλυκοκορτικοειδών στους ιστούς, με την κορτιζόλη να μένει συνδεδεμένη με αυτές, στην πλειονότητα της. Συγκεκριμένα, στην ενεργή της μορφή είναι ελεύθερη κορτιζόλη, και η 11β-αφυδρογόναση των υδροξυστεροειδών τύπου 2 μπορεί να την μετατρέψει στην ανενεργή της μορφή (κορτιζόνη), ενώ η τύπου 1 έχει τον αντίστροφο ρόλο (Kadmiel & Cidlowski, 2013)(εικόνα 1). Η κορτιζόλη μεταφέρεται στο αίμα συνδεόμενη κυρίως με τη σφαιρίνη των κορτικοστεροειδών (CBG). Η CBG όχι μόνο διευκολύνει τη διανομή της κορτιζόλης αλλά παίζει επίσης ρόλο στην απελευθέρωσή της στους ιστούς. Η κορτιζόλη χωρίς CBG διαχέεται παθητικά διαμέσου της πλασματικής μεμβράνης. (Benzie & Strain, 1996) Από τα πιο διαδεδομένα συνθετικά γλυκοκορτικοειδή είναι η δεξαμεθαζόνη και η κορτιζόνη, τα οποία κιόλας ομοιάζουν με τα φυσικά. Ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα της δεξαμεθαζόνης, την οποία χρησιμοποιήσαμε και στην παρούσα μελέτη, είναι το γεγονός ότι δεν απενεργοποιείται από την 11β-HSD2, αυξάνοντας τη διαθεσιμότητα της. Επιπρόσθετα, τα συνθετικά γλυκοκορτικοειδή δεν έχουν την ικανότητα σαν τα φυσικά να συνδέονται με σφαιρίνες CBG (corticosteroid binding globulin), με αποτέλεσμα να μη ρυθμίζονται τα διαθέσιμα επίπεδα τους. (Kadmiel & Cidlowski, 2013)



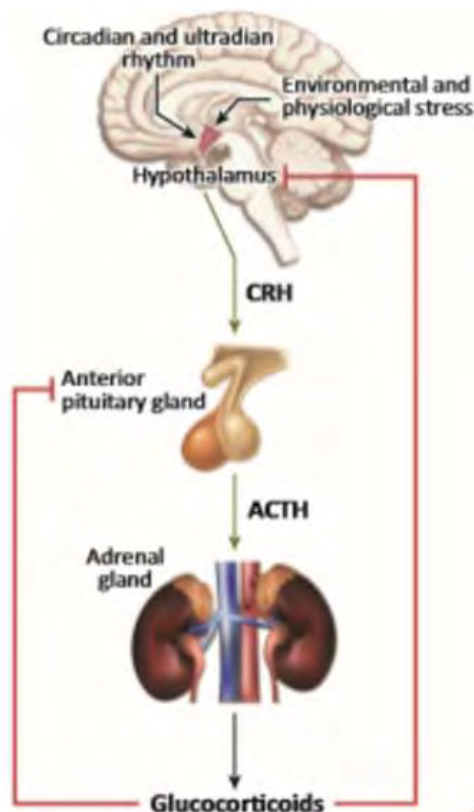
Εικόνα 3:



Η μετατροπή της κορτιζόλης από την ενεργή στην ανενεργή μορφή μέσω των ενζύμων 11β-αφυδρογονάση των υδροξυστεροειδών τύπου 1 και 2 και που εντοπίζεται η κάθε μια.(Hintzpeter, Stapelfeld, Loerz, Martin, & Maser, 2014)

### 1.2.2. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ

Η σύνθεση και απελευθέρωση των γλυκοκορτικοειδών από τον φλοιό των επινεφριδίων πραγματοποιείται ως απόκριση στο στρες με κίρκαδικό ρυθμό και ελέγχεται από τον άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων. Η ενεργοποίηση του υποθαλάμου γίνεται από εξωτερικά και εσωτερικά σήματα, με αποτέλεσμα να απελευθερώνεται η ορμόνη κορτικοτροπίνη (CRH), η οποία με την σειρά της δρα στην πρόσθια υπόφυση και διεγείρει τη σύνθεση και την έκκριση της αδρενοκορτικοτροπικής ορμόνης (ACTH). Αυτή, έπειτα, επιδρά στον φλοιό για να διεγείρει την παραγωγή των γλυκοκορτικοειδών. Τα γλυκοκορτικοειδή ως απόκριση στο στρες και το κίρκαδικό ρυθμό δρουν σχεδόν σε όλους τους ιστούς και στα όργανα του σώματος διατηρώντας την ομοιόσταση. Οι δράσεις τους καλύπτουν ένα μεγάλο πλέγμα διεργασιών, όπως τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, του ενδιάμεσου μεταβολισμού, της καρδιαγγειακής λειτουργίας, της αναπαραγωγής και της γνωστικής ανάπτυξης. Τα ίδια τα γλυκοκορτικοειδή με την παραγωγή τους επιδρούν στην πρόσθια υπόφυση και στον υποθάλαμο για να περιορίσουν την επιπλέον παραγωγή και απελευθέρωση της CRH και ACTH για κρατήσουν σε χαμηλά επίπεδα το μέγεθος και τη διάρκεια τους, κάτι που ονομάζεται βρόγχος αρνητικής ανάδρασης (εικόνα 2) (Kadmiel & Cidlowski, 2013).



Εικόνα 4:

Σχηματική απεικόνιση της ρύθμισης των επιπέδων γλυκοκορτικοειδών από τον άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων (HPA). Η σύνθεση και η απελευθέρωση των γλυκοκορτικοειδών βρίσκεται κάτω από δυναμική κίρκαδικού ρυθμού στον περιφεριακό πυρήνα του υποθαλάμου. Η ορμόνη κορτικοτροπίνη (CRH) που εκκρίνεται από τον υποθάλαμο διεγείρει την απελευθέρωση της αδρενοκορτικοτροπικής ορμόνης (ACTH) από την πρόσθια υπόφυση. Με τη σειρά της, η ACTH επάγει τη σύνθεση και την έκκριση κορτιζόλης από τον φλοιό των επινεφριδίων στην κυκλοφορία του αίματος., το μεγαλύτερο μέρος της κορτιζόλης παραμένει δεσμευμένο σε σφαιρίνες δέσμευσης κορτικοστεροειδών. Η ομοιόσταση στα επίπεδα γλυκοκορτικοειδών διατηρείται από τον βρόχο αρνητικής ανάδρασης που καταστέλλει τα επίπεδα της ACTH στην πρόσθια υπόφυση και τα επίπεδα CRH στον υποθάλαμο.(Kadmiel & Cidlowski, 2013)

### **1.2.3. ΠΑΡΕΝΕΡΓΕΙΕΣ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ**

Παρόλα τα πολλαπλά οφέλη που προσφέρουν τα γλυκοκορτικοειδή, δυστυχώς έρχονται σε αντιδιαστολή με τις σοβαρές αρνητικές επιδράσεις που προκαλούν σε ασθενείς στους οποίους χορηγούνται για μεγάλο χρονικό διάστημα. Μεταξύ των παρενεργειών είναι η ανάπτυξη διαβήτη, η οστεοπόρωση, η μυϊκή αδυναμία, η υπέρταση και, η παχυσαρκία. Επίσης, πολλοί ασθενείς αναπτύσσουν ιστοειδική αντίσταση όταν τους χορηγούνται μακροχρόνια γλυκοκορτικοειδή. Για όλες αυτές τις επιδράσεις, κρίθηκε η ανάγκη κατανόησης της κυτταρικής απόκρισης των γλυκοκορτικοειδών σε μοριακό επίπεδο ώστε να διευκολυνθεί η ανάπτυξη νέων γλυκοκορτικοειδών με όσο είναι δυνατό λιγότερες παρενέργειες (Oakley & Cidlowski, 2013).

## **1.3. Ο ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ (GR)**

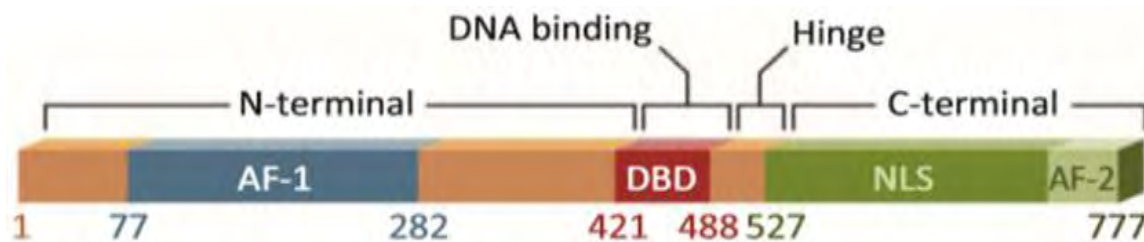
### **1.3.1. ΓΕΝΙΚΑ**

Οι φυσιολογικές και φαρμακολογικές δράσεις των γλυκοκορτικοειδών διαμεσολαβούνται από τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών.(Oakley&Cidlowski, 2013). Οι επιδράσεις των γλυκοκορτικοειδών συνήθως εξαρτώνται από την αλληλεπίδραση με το GR στο κυτταρόπλασμα, προκαλώντας ποικιλία κυτταρικών αποκρίσεων και κατά συνέπεια αρκετές αλλαγές σε όλο το σώμα (Scheschowitsch, Leite, & Assreuy, 2017)(Scheschowitsch et al., 2017). Ο GR ανήκει στην υπεροικογένεια πυρηνικών υποδοχέων στεροειδούς / θυρεοειδούς / ρετινοϊκού οξέος και λειτουργεί ως προσδετό-εξαρτώμενος μεταγραφικός παράγοντας, που ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων που αποκρίνονται σε γλυκοκορτικοειδή (Nicolaidis, Galata, Kino, Chrousos, & Charmandari, 2010)

### **1.3.2. ΔΟΜΙΚΕΣ ΕΠΙΚΡΑΤΕΙΕΣ ΤΟΥ GR**

Η δομή του υποδοχέα αποτελείται από τρεις κύριες υπομονάδες 1) N-τελική επικράτεια trans-ενεργοποίησης της μεταγραφής (NTD), 2) μια κεντρική επικράτεια δέσμευσης στο DNA (DNABindingDomain, DBD) και μια C-τελική επικράτεια σύνδεσης του προσδέτη (LigandBindingDomain, LBD). Οι DBD και το LBD διαχωρίζονται από μια εύκαμπτη περιοχή που ονομάζεται περιοχή άρθρωσης.Η(DBD) περιέχει δύο μοτίβα δακτύλου ψευδαργύρου που είναι αυτά που αναγνωρίζουν και δεσμεύουν τις αλληλουχίες στόχους στο DNA, τα οποία καλούνται στοιχεία απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή (GREs).Η DBD αποτελεί την πιο συντηρημένη περιοχή στην οικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων, ενώ η NTD περιέχει μια ισχυρή λειτουργία μεταγραφικής ενεργοποίησης (AF1), επιτρέποντας τη συσσώρευση συν-ρυθμιστών και του μηχανισμού της

μεταγραφής. Η LBD, αποτελούμενη από 4 β-πτυχωτά φύλλα και 12 α-έλικες, σχηματίζει έναν υδρόφοβο θύλακα για τη δέσμευση των γλυκοκορτικοειδών. Επιπρόσθετα, η LBD αλληλεπιδρά με συν ρυθμιστές με προσδετό- εξαρτώμενο τρόπο και περιέχει δεύτερη λειτουργία ενεργοποίησης (AF2). Επίσης, στη DBD, στην περιοχή άρθρωσης, καθώς και στην LBD εντοπίζονται σήματα πυρηνικού εντοπισμού που επιτρέπουν την μετατόπιση στον πυρήνα (Kadmiel & Cidlowski, 2013; Scheschowitsch et al., 2017)



**Εικόνα 5:**

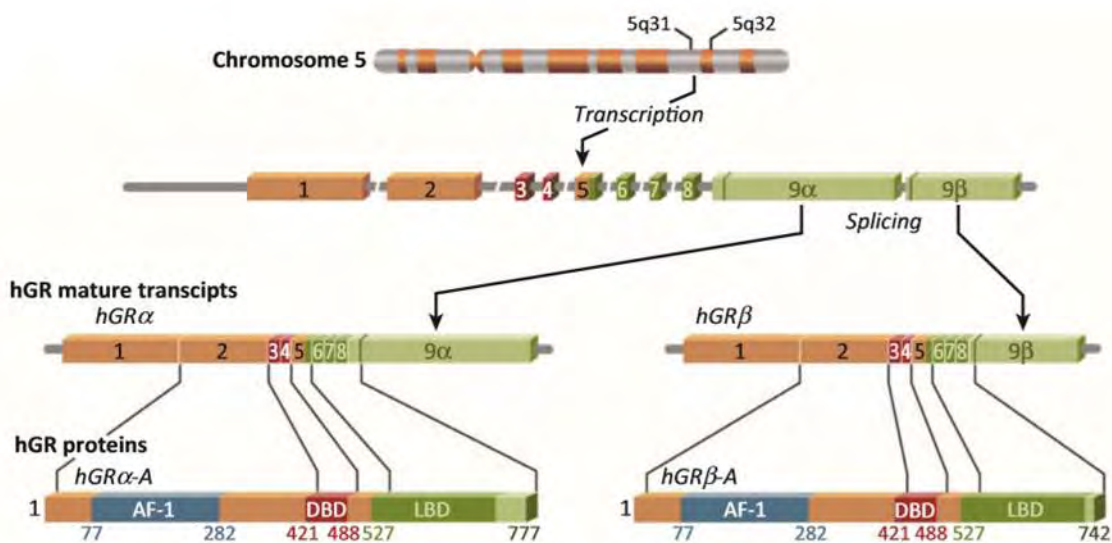
*Η σχηματική απεικόνιση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών. Ο GR είναι αρθρωτή πρωτεΐνη που περιέχει μια N-τερματική περιοχή διενεργοποίησης (NTD), έναν κεντρικό τομέα σύνδεσης DNA (DBD), μία C-τερματική περιοχή σύνδεσης στο προσδετή (LBD) και μια εύκαμπτη "περιοχή άρθρωσης" που διαχωρίζει τη DBD και τη LBD. Η NTD έχει μια ισχυρή ικανότητα ενεργοποίησης της μεταγραφής (AF1) που επιτρέπει την στρατολόγηση συντονιστών και μηχανισμών μεταγραφής. Τα γλυκοκορτικοειδή δεσμεύουν τον υδρόφοβο θύλακα της LBD, προκαλώντας τη δεύτερη λειτουργία ενεργοποίησης (AF2), που βρίσκεται στην ίδια τη LBD. Οι DBD / αρθρωτή περιοχής και LBD περιέχουν η κάθεμία τους ένα σήμα πυρηνικής εντοπισμού που επιτρέπει μετατόπιση του GR στον πυρήνα. (Kadmiel&Cidlowski, 2013)*

### 1.3.3. ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΑ ΜΕΤΑΓΡΑΦΑ ΤΟΥ GR

Το γονίδιο του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (NR3C1) περιέχει 9 εξόνια με την πρωτεϊνική- κωδική περιοχή να σχηματίζεται από τα εξόνια 2-9. Το 1 σχηματίζει τη 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή. Εναλλακτικά ματίσματα του GR σχηματίζουν τις ισομορφές GRα και GRβ, οι οποίες είναι πανομοιότυπες μέχρι το αμινοξύ 727, αλλά έχουν διαφορετικό C τερματικό άκρο. Η α ισομορφή είναι υπεύθυνη για το σηματοδοτικό μονοπάτι του GR, δεσμεύοντας τα γλυκοκορτικοειδή και αποτελεί την ισομορφή που είναι σε αφθονία. Σε αντίθεση με την α ισομορφή, η β δε δεσμεύει αγωνιστές του GR, αλλά παραμένει σε ιδιοσυστατικά ανενεργή μορφή στον πυρήνα των κυττάρων. Ωστόσο έχει βρεθεί ένας αγωνιστής, ο RU486 που προσδένεται σε αυτή και ενεργοποιεί την μεταγραφική της δραστηριότητα. Δεδομένα έχουν δείξει ότι η GRβ λειτουργεί ανασταλτικά και ανταγωνιστικά στη δραστηριότητα της GRα σε γονίδια στόχους που ανταποκρίνονται σε γλυκοκορτικοειδή. Εναλλακτικό μάτισμα του γονιδίου του υποδοχέα GR δημιουργεί επιπλέον ισομορφές του, τη GRγ, GR-A και GR-P για τις οποίες δεν είναι πολλά γνωστά



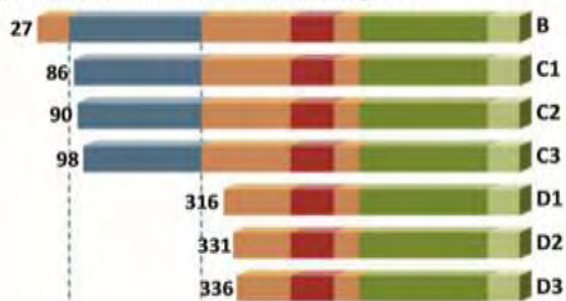
μέχρι στιγμής, ωστόσο έχει βρεθεί ότι συσχετίζονται με την αντοχή στα γλυκοκορτικοειδή (Kadmiel & Cidlowski, 2013).



**Εικόνα 6:**

*GR υποβάλλεται σε εναλλακτικό μάτισμα για να δώσει λειτουργικά ξεχωριστούς υποτύπους του. Το γονίδιο του GR περιέχει εννέα εξόνια, με την κωδική περιοχή να σχηματίζεται από τα εξόνια 2-9. Το εναλλακτικό μάτισμα του γονιδίου του GR δημιουργεί τις ισομορφές hGRα και hGRβ, οι οποίες διαφέρουν στα C άκρα τους .(Kadmiel&Cidlowski, 2013).*

**(i) hGRα N-terminal translational isoforms:**



**(ii) Predicted hGRβ N-terminal translational isoforms:**



**Εικόνα 7:**

*Η ισομορφή GRαα υφίσταται εναλλακτική εκκίνηση μετάφρασης στο εξόνιο 2, δημιουργώντας οκτώ επιπρόσθετες ισομορφές GR με κολοβωμένα άκρα N (GRα-A, GRα-B, GRα-C1, GRα-C2, GRα-C3, GRα-D1, GRα-D2, GRαD3). Η GRβ παράγει επίσης οκτώ ισομορφές β παρόμοιες με τη hGRαα.(Kadmiel&Cidlowski, 2013)*

### 1.3.4. ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΟΤΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΤΟΥ GR

#### Κλασσικό Μονοπάτι

Ο GR βρίσκεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων συνδεόμενος με πρωτεΐνες θερμικού σοκ και ανοσοφιλίνες, αυτές διατηρούν τον υποδοχέα σε μια ανενεργή μεταγραφικά κατάσταση, διατηρώντας όμως παράλληλα τη δέσμευση με τον προσδέτη, με υψηλή συγγένεια. (Psarra & Sekeris, 2008)

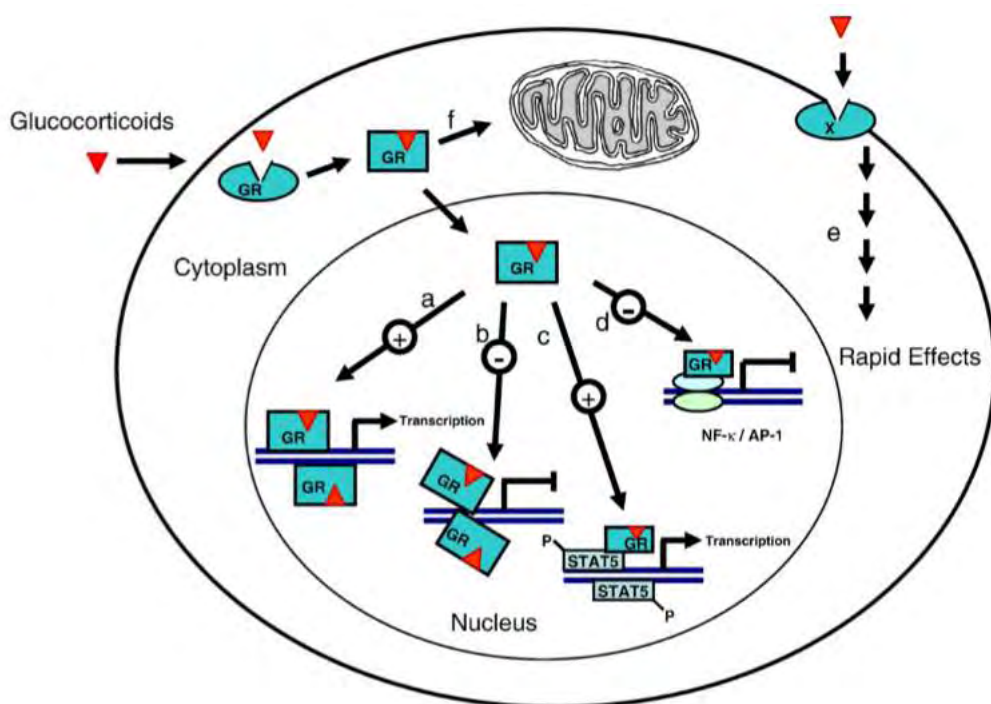
Η σύνδεση των γλυκοκορτικοειδών στον GR οδηγεί τον υποδοχέα στον πυρήνα μέσω των πυρηνικών πόρων. Μέσα στον πυρήνα ο GR έχει την ικανότητα να δεσμεύεται άμεσα στα GREs με αυτό τον τρόπο ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων στόχων του. Από έρευνες που έχουν γίνει έχει βρεθεί ότι GREs μεσολαβούν στην εξαρτώμενη από γλυκοκορτικοειδή έκφραση πολλών γονιδίων και έτσι αναφέρονται ως ενεργοποιητικά ή θετικά GRE. Ωστόσο, πρόσφατες γενωμικές μελέτες αποκάλυψαν ότι η σύνδεση του GR στα GREs μπορεί επίσης να οδηγήσει στην καταστολή των γονιδίων στόχων. (Oakley & Cidlowski, 2013; Psarra & Sekeris, 2008; Scheschowitsch et al., 2017)

Εκτός από την ικανότητα του GR ρυθμίζει τα γονίδια στόχους του με την σύνδεση του στα GREs μπορεί να το κάνει μέσω σύνδεσης με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, όπως AP-1, NF-κΒ, p53 και τα STAT. Έχει αποδειχθεί ότι η σύνδεση του GR με κάποια συγκεκριμένα μέλη της οικογένειας STAT (signal transducers and activators of transcription), ενισχύει τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων, με ή χωρίς σύνδεση GRE. Όταν ο GR αλληλεπιδρά με τους προ-φλεγμονώδεις μεταγραφικούς παράγοντες, AP1 και NF-κΒ, ανταγωνίζεται τη δραστηριότητά τους και θεωρείται ότι είναι ένας πρωταρχικός μηχανισμός με τον οποίο τα γλυκοκορτικοειδή καταστέλλουν τη φλεγμονή. Η σύνδεση μεταξύ του ενεργού GR και του NF-κΒ μεσολαβείται από τον δεύτερο δάκτυλο ψευδαργύρου στην υπομονάδα DBD. Συγκεκριμένα, ο GR συνδέεται απευθείας με την υπομονάδα Jun του AP1 και την υπομονάδα p65 του NF-κΒ και παρεμβαίνει στη λειτουργία μεταγραφικής ενεργοποίησης αυτών των δύο πρωτεϊνών (Nicolaidis et al., 2010; Oakley & Cidlowski, 2013)

Πρόσφατες μελέτες έχουν αποδείξει τον μιτοχονδριακό εντοπισμό όχι μόνο του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών αλλά και άλλων υποδοχέων στεροειδών ορμονών. Ειδικότερα, ο GR συνδέεται σε αλληλουχίες του DNA του μιτοχονδρίου και ενεργοποιεί τη μεταγραφή μιτοχονδριακών γονιδίων, όπως γονίδια της αναπνευστικής αλυσίδας (OXPHOS), οδηγώντας στην ενεργοποίηση της βιοσύνθεσης των ενζύμων της OXPHOS. Με αυτόν τον τρόπο, ενισχύει τη λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας με αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή μιτοχονδριακού ATP (τριφωσφορικής αδενοσίνης) (Psarra & Sekeris, 2008, 2009, 2011)

## ΜΗ ΚΛΑΣΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ

Όλο και περισσότερα πειραματικά δεδομένα υποδηλώνουν ότι ο GR μπορεί επίσης να δράσει μέσω μη γονιδιωματικών μηχανισμών προκαλώντας ταχείες κυτταρικές αποκρίσεις που συμβαίνουν μέσα σε λίγα δευτερόλεπτα έως λεπτά, χωρίς τροποποίηση της μεταγραφής. Πολλοί μηχανισμοί φαίνεται ότι εμπλέκονται σε αυτά τα συμβάντα σηματοδότησης, επηρεάζοντας τελικά τη δραστηριότητα διαφόρων κινασών, όπως της PI3K, της AKT και της MAPK. Από την βιβλιογραφία αναφέρεται ότι ο GR εντοπίζεται σε μικρά κυστίδια μέσω αλληλεπίδρασης με την καβεολίνη 1 στην πλασματική μεμβράνη. Όταν απελευθερώνεται από το σύμπλοκο με τον GR, η c-Src ενεργοποιεί πολλές κινάσες που οδηγούν στη φωσφορυλίωση της αννεξίνης 1, στην αναστολή της δραστηριότητας της κυταρολυτικής φωσφολιπάσης A2 και στην εξασθένηση της απελευθέρωσης του αραχιδονικού οξέος. Η ύπαρξη μη γονιδιακής σηματοδότησης παρουσιάζει μεγαλύτερη πολυπλοκότητα και ποικιλομορφία στα γλυκοκορτικοειδή και τις βιολογικές τους δράσεις και αυξάνει την πιθανότητα ότι οι εκλεκτικοί ρυθμιστές των γονιδιακών ή μη γονιδιωματικών οδών που εξαρτώνται από GR να υπερτερούν θεραπευτικά. (Oakley&Cidlowski, 2013)



Εικόνα 8:

*Αναπαράσταση της δράσης των γλυκοκορτικοειδών. Οι στεροειδείς ορμόνες, συνδέονται στο υποδοχέα GR και τον ενεργοποιούν. Ο GR με την σειρά του μέσω απευθείας σύνδεσης στο DNA ρυθμίζει την γονιδιακή έκφραση ενεργοποιώντας ή καταστέλλοντας τη μεταγραφή (a,b) . Αυτό το πετυχαίνει και μέσω δέσμευσης του σε μεταγραφικούς παράγοντες. (c,d). Μπορεί να σηματοδοτεί με μη-γενωμικό τρόπο μέσω αλλαγών της δραστηριότητας ποικίλων κινασών(ε). Εκτός των άλλων στα μιτοχόνδρια το σύμπλοκο γλυκοκορτικοειδές-υποδοχέα αλληλεπιδρά με τον γονιδίωμα του και μπορεί να ενεργοποιεί την μιτοχονδριακή μεταγραφή. (f)(Psarra&Sekeris, 2008)*

## **1.4. ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ ΚΑΙ ΤΟΥ GR ΣΤΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ**

### **1.4.1 ΑΝΤΙΦΛΕΓΜΟΝΩΔΕΙΣ ΔΡΑΣΕΣ ΤΟΥ GR**

Έρευνες έχουν αποδείξει ότι τα γλυκοκορτικοειδή δρουν ως ανοσοκατασταλτικά μόρια σε αρχικά στάδια φλεγμονώδους απόκρισης προάγοντας λύση. Πιο καλά μελετημένοι είναι οι μηχανισμοί που συνδέονται με την καταστολή της αρχικής απόκρισης. Ένας αξιοσημείωτος ρόλος των γλυκοκορτικοειδών είναι ότι αναστέλλουν την αγγειοδιαστολή και την αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα που εμφανίζονται μετά τη φλεγμονώδη προσβολή και μειώνουν τη μετανάστευση των λευκοκυττάρων στις περιοχές της φλεγμονής. Έπειτα, εμπλέκονται στην διανομή, στην μετακίνηση, στο θάνατο, στην επιβίωση και κυρίως στην κυτταρική διαφοροποίηση των λευκοκυττάρων. Οι μεταγραφικές επιδράσεις των αγωνιστών του GR είναι υπεύθυνες για τις αντιφλεγμονώδεις και ανοσοκατασταλτικές δράσεις των γλυκοκορτικοειδών άμεσα ή έμμεσα, μεταβάλλοντας που μεταβάλλουν τη μεταγραφή πολυάριθμων γονιδίων σε λευκοκύτταρα,. Συγκεκριμένα, τα γλυκοκορτικοειδή είναι υπεύθυνα για την καταστολή της μεταγραφής πολλών γονιδίων που κωδικοποιούν προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες και χημειοκίνες, μόρια κυτταρικής προσκόλλησης και βασικά ένζυμα εμπλεκόμενα στην έναρξη και / ή τη διατήρηση της φλεγμονώδους απόκρισης του ξενιστή. Όλα αυτά τα αποτελέσματα έχουν αποδοθεί εν μέρει στη σηματοδότηση του GR που καταστέλλει τη δραστηριότητα NF-κΒ και AP-1, καθώς και άλλων βασικών μεταγραφικών παραγόντων της ανοσολογικής απόκρισης. Αυτό συμβαίνει μέσω trans-ενεργοποίησης από τον GR του αναστολέα του NF-κΒ, IκΒ, ο οποίος βρίσκεται σε σύμπλοκο με τον NF-κΒ στο κυτταρόπλασμα, αλλά φαίνεται να περιορίζεται σε ορισμένους κυτταρικούς τύπους και όχι να αποτελεί έναν καθολικό μηχανισμό. (Coutinho & Chapman, 2011).

### **1.4.2. ΠΡΟ-ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ GR**

Τα γλυκοκορτικοειδή αποτελούν ισχυρούς επαγωγείς της απόπτωσης σε πολλούς κυτταρικούς τύπους όπως στα θυμοκύτταρα και στα λευχαιμικά κύτταρα. Ένα ισχυρό παράδειγμα αποπτωτικής δράσης την ασκούν μέσω του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών στο σκελετικό σύστημα, και με την χρόνια χορήγηση τους μπορεί να οδηγήσει στην

εμφάνιση οστεοπόρωσης. Συγκεκριμένα, δρουν στους οστεοβλάστες αντι-πολλαπλασιαστικά και προ-αποπτωτικά, μέσω αύξησης προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών όπως της Bim και καταστολής αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών, όπως τις Bcl-2, Bcl-XL και Mcl-2. Επιπροσθέτως, τα γλυκοκορτικοειδή έχει αναφερθεί ότι αυξάνουν την επιβίωση των οστεοκλαστών, που είναι υπεύθυνοι για την απορρόφηση του οστού, ενώ προκαλούν και αποπτωτικές επιδράσεις στα κύτταρα του χόνδρου. Είναι ευρέως γνωστό ότι η θεραπεία με γλυκοκορτικοειδή αναστέλλει, επίσης τον πολλαπλασιασμό των χονδροκυττάρων, την υπερτροφία και την παραγωγή της μήτρας του χόνδρου, συμβάλλοντας στη μειωμένη διαμήκη ανάπτυξη των οστών. Να προστεθεί, ότι αυξημένη ποσότητα γλυκοκορτικοειδών μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη μυοπάθειας, μέσω αυξημένου καταβολισμού πρωτεϊνών και απόπτωσης, η οποία έχει συνδεθεί με την ενεργοποίηση του μονοπατιού FADD- Fasligand, ενεργοποίηση της κασπάσης 8 και αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων των προ-αποπτωτικών μορίων Bax, Bad και Bid. Άλλοι ομάδες μυών που προκαλούν απόπτωση τα γλυκοκορτικοειδή είναι οι λείοι μύες του αναπνευστικού συστήματος, όπου έχει αποδειχθεί ότι το προκαλούν μέσω της αύξησης της έκφρασης της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bax και μείωσης της έκφρασης της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2. Να σημειωθεί όμως ότι τα ασκούν και θετικές δράσεις στη θεραπεία των ασθενειών των αεραγωγών, όπως της καταστολής της φλεγμονής σε περιπτώσεις όπως το άσθμα. Τα τελευταία χρόνια έχουν μελετηθεί εκτεταμένα οι αποπτωτικές των γλυκοκορτικοειδών στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Τα γλυκοκορτικοειδή είναι σημαντικά για την επιλογή των T κυττάρων, την ομοιοστάση του ανοσοποιητικού συστήματος, και την επίλυση της ανοσοαπόκρισης μετά την κάθαρση της λοίμωξης. Οι αντιφλεγμονώδεις επιδράσεις των γλυκοκορτικοειδών και η απόπτωση που προκαλείται από GC οδήγησαν στη χρήση της στεροειδικής θεραπείας ως ανεκτίμητο μέρος της θεραπείας σε πολλές κλινικές περιπτώσεις, όπως στη θεραπεία κακοηθειών του ανοσοποιητικού συστήματος. Υψηλές δόσεις γλυκοκορτικοειδών είναι γνωστό ότι προκαλούν απόπτωση στα θυμοκύτταρα, τα T κύτταρα, τα B κύτταρα, τα μακροφάγα, τα ώριμα αλλά όχι τα ανώριμα δενδριτικά κύτταρα, τα ηωσινόφιλα και τα φυσικά φονικά κύτταρα. Στα ουδετερόφιλα από την άλλη πλευρά όμως ασκούν θετική δράση προστατεύοντας τα από την απόπτωση. Στο ενδοκρινικό σύστημα τώρα, μεταβάλλει τον μεταβολισμό της γλυκόζης και συμβάλλει έτσι στην ανάπτυξη διαβήτη τύπου II. Τέλος, το πάγκρεας, το οποίο παράγει ινσουλίνη, είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο στις αποπτωτικές επιδράσεις των γλυκοκορτικοειδών. Οι μηχανισμοί δράσης περιλαμβάνουν την καταστολή της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 οδηγώντας σε απο-φωσφορυλίωση της προαποπτωτικής πρωτεΐνης BAD. Όλα αυτά μπορούν να οδηγήσουν στη μείωση της λειτουργικότητας των β-κυττάρων και κατα συνέπεια στην ανάπτυξη σακχαρώδους διαβήτη. (Psarra&Sekeris, 2008)(Gruver-Yates & Cidlowski, 2013)

### **1.4.3. ANTI-ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ GR**

Πολλοί τύποι κυττάρων εμφανίζουν αντιαποπτωτική απόκριση στη σηματοδότηση γλυκοκορτικοειδών. Όπως έχει προαναφερθεί, τα ουδετερόφιλα παρουσιάζουν ένα αντι-αποπτωτικό αποτέλεσμα σε απόκριση των γλυκοκορτικοειδών και όχι μόνο. Τα ωοθυλακικά κύτταρα των ωοθηκών έχουν αντιαποπτωτική απόκριση στη σηματοδότηση γλυκοκορτικοειδών. Επίσης, τα ηπατοκύτταρα και τα λιποκύτταρα έχουν δείξει ότι εμφανίζουν αντι-αποπτωτική απόκριση στα γλυκοκορτικοειδή. Έχει βρεθεί ότι η δεξαμεθαζόνη αναστέλλει την αυθόρμητη απόπτωση σε πρωτογενή ηπατοκύτταρα ανθρώπου και αρουραίου με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο. Οι αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες Bcl-2 και Bcl-xL αυξήθηκαν με θεραπεία με δεξαμεθαζόνη και η προ-αποπτωτική έκφραση του Bax και η μετατόπιση του Bad μειώθηκε με θεραπεία με δεξαμεθαζόνη σε αυτά τα ηπατοκύτταρα. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός, πως τα γλυκοκορτικοειδή μπορούν να ρυθμίσουν τις αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες αυξάνοντας ή μειώνοντας τις με συγκεκριμένο ιστοειδικό τρόπο. Δύο πρόσθετα όργανα όπου τα γλυκοκορτικοειδή είναι κυτταροπροστατευτικά είναι η καρδιά και ο νεφρός. Τα γλυκοκορτικοειδή μπορούν να προστατεύσουν από καρδιακή βλάβη από ισχαιμία του μυοκαρδίου / επαναιμάτωση και να αναστέλλουν απευθείας την απόπτωση των καρδιομυοκυττάρων. Παρομοίως, τα γλυκοκορτικοειδή είναι γνωστό ότι έχουν προστατευτικό αποτέλεσμα στους νεφρούς. Η δεξαμεθαζόνη προστατεύει τα νεφρικά μεσαγγειακά κύτταρα των αρουραίων από την απόπτωση που προκαλείται από το στρες με ρύθμιση των επιπέδων φωσφορικής σφιγγοσίνης-1 (S1P), τα οποία μπορούν να διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και να εξουδετερώσουν τους αποπτωτικούς μηχανισμούς. Ένας παρόμοιος μηχανισμός δράσης έχει ταυτοποιηθεί σε ανθρώπινα κύτταρα ινοβλαστών. Έτσι, είναι αρκετά σαφές ότι διάφοροι τύποι κυττάρων που απαντώνται φυσιολογικά ιστό της καρδιάς και των νεφρών παρουσιάζουν αντι-αποπτωτικό αποτέλεσμα σε απόκριση σε γλυκοκορτικοειδή, αντί να υποβάλλονται σε απόπτωση που προκαλείται από GC. (Gruver-Yates & Cidlowski, 2013; Oakley & Cidlowski, 2013)

### **1.5. ΠΩΣ ΜΕΣΟΛΑΒΕΙ Η ΜΑΣΤΙΧΑ ΧΙΟΥ ΣΤΗ ΣΥΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ ΤΟΥ GR ΚΑΙ ΠΟΙΑ ΕΙΝΑΙ Η ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΗΣ**

Οι ευεργετικές βιολογικές δράσεις τις Μαστίχας Χίου αποδίδονται σε μια ποικιλία δραστικών συστατικών που έχουν εντοπιστεί στο εκχυλισμά της, όπως τα μονοτερπένια, τριτερπένια, φυτοστερόλες, πολυφαινολικά μόρια, φυσικά πολυμερή και πολλά ακόμη. Τα κύρια τριτερπενικά οξέα όπως το μαστιχαδιενονικό οξύ (12%), το ισομαστιχαδιενονικό οξύ (12%), το ολεανονικό οξύ (6%), το μορονικό οξύ (6%), το μαστιχαδιενολικό οξύ, το ισομαστιχαδιενολικό οξύ και το ολεανολικό οξύ αποτελούν το

όξινο κλάσμα της Μαστίχας Χίου. Το ουδέτερο κλάσμα αποτελείται από ουδέτερα τριτερπενικά συστατικά όπως η ολεανολική αλδεύδη, η 28-νορολεαν-17-εν-3-όνη, η τρουκαλόλη, η β-αμυρίνη, η ισομαστιχαδιενολική αλδεύδη και η δαμαραδιενόνη. Άλλα συστατικά που έχουν εντοπιστεί στο εκχύλισμα σε μικρότερες συγκεντρώσεις είναι η βερμπενόνη, το α-τερπινολένιο, η λιναλοόλη, το καμφένιο, καθώς και ίχνη γαλλικού οξέος. Τέλος το έλαιο της Μαστίχας Χίου έχουν απομονωθεί δύο αρωματικά μονοτερπένια, το α-πινένιο (67%) και το μυρσένιο (18%), τα οποία καταλαμβάνουν το μεγαλύτερο μέρος. Αυτά είναι τα συστατικά που είναι υπεύθυνα για τις αντιφλεγμονώδεις, αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές, αντικαρκινικές, υπογλυκαιμικές, και υπολιπιδαιμικές δράσεις της Μαστίχας Χίου, ο συνδυασμός δύο ή περισσότερων αυτών τα καθιστούν πιο αποτελεσματικά από το καθένα μεμονωμένα. (Loizou et al., 2009, Georgiadis et al., 2014)

Τα πιο άφθονα συστατικά του εκχυλίσματος της Μαστίχας Χίου είναι τα τριτερπένια, τα οποία δομικά είναι όμοια με τα γλυκοκορτικοειδή και ασκούν τις δράσεις τους μέσω του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών. Επάγουν την ενεργοποίηση του, την μετακίνηση του στον πυρήνα του κυττάρου, όπου δρα ως μεταγραφικός παράγοντας ενεργοποιώντας ή αναστέλλοντας την έκφραση των γονιδίων στόχων του. (Georgatza et al., 2016; Tzani, Georgiadis, et al., 2016)

## **1.6. ΣΚΟΠΟΣ**

Η παρούσα διπλωματική εργασία έχει σκοπό να διερευνήσει τις αντικαρκινικές αντι-υπεργλυκαιμικές δράσεις εκχυλισμάτων από τη ρητίνη (Μαστίχα Χίου) ή τα φύλλα του μαστιχόδεντρου. Απώτερος στόχος είναι η διαλεύκανση των μοριακών μηχανισμών μέσω των οποίων ασκούνται οι βιολογικές δράσεις και ειδικότερα η διερεύνηση του κατά πόσο αυτές διαμεσολαβούνται στη σηματοδότηση του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, ώστε τα επόμενα χρόνια να μπορούν αξιοποιηθούν ως αγωνιστές του για την καταπολέμηση σοβαρών ασθενειών, χωρίς ταυτόχρονα να ενεργοποιούν τις επιβλαβείς παρενέργειες της σηματοδότησής του.

## **2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **2.1. ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ**

- Heatblocker: KISKER
- Quick spin: Nippon Genetics Europe GmbH
- Sonicator: helscher Ultrasound Technologies, model UP400S

- Vortex: Bio Vortex V1
- Αναδευτήρας: Heidolph Rotamax
- Ανάστροφο Μικροσκόπιο (αντίθεσης φάσης): A. KrussOptronicGermany
- Επωαστήρας: Thermo Electron Corporation
- Υδατόλουτρο: P SELECTA
- Ζυγοί: KERN EW + KERN 440-47 N
- Σκοτεινός θάλαμος και σετ εμφάνισης μεμβρανών από W.B Kodak
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης: Biorad mini-PROTEAN® tetra cell
- Συσκευή καθέτου νηματικής ροής (Laminar Flow Hood) Tel Star AV-30/70
- Συσκευή μεταφοράς (transfer): Biorad mini-trans Blot
- Φυγόκεντρος: Epperdof,Centrifuge 5417R
- Φυγόκεντρος κυτταροκαλλιιεργειών: Entrofriger- BLII/ PS Selecta®
- Φωτόμετρο Spectronic® 20 GENESYSTM

## **2.2. ΥΛΙΚΑ**

### **2.2.1. ΧΗΜΙΚΑ**

- Acrylamide/Bis acrylamide 40% (Bio-Rad)
- Ammonium persulfate, APS (Sigma)
- Bradford protein assay (Bio-Rad)
- Bromophenol blue (fluka)
- Dexamethazone (Riedel-de Haën)
- DMSO (Sigma)
- DTT (SERVA)
- Developer (Carestream)



- ECL A + ECL B (Santa Cruz)
- FBS (Gibco®)
- FBS cis (biosera)
- Fixer (Fuji)
- Glycin (AppliChem)
- HCl (Merck)
- L-Glutamine (Gibco)
- NaCl (Panreac)
- RBS 1x (Gibco)
- Protease inhibitors (Sigma)
- Sodium Dodecyl Sulfate, SDS (SIGMA)
- Skimmed milk powder (Regilait)
- TEMED (Applichem)
- Tris-base (Merk, SERVA)
- Trypsin-EDTA 5% 10× (Gibco, Sigma)
- Tween 20 (Euroclone, Sigma)
- Αιθανόλη 100% (SIGMA)
- Βιοαιθανόλη (Kalochem)
- β-μερκαπτοαιθανόλη (Riedel-de Haën)
- Μάρτυρας μοριακών μεγεθών PAGERuler (ThermoScientific Fermentas)
- Μεθανόλη 100% (Sigma)

### **2.2.2. ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΜΑΣΤΙΧΑΣ ΧΙΟΥ**

Δείγματα από τα φύλλα και τη ρητίνη του μαστιχόδεντρου προμηθεύτηκαν από την Ένωση Μαστιχοπαραγωγών Χίου, ενώ η κλασμάτωση τους πραγματοποιήθηκε στο Τμήμα Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου Piemonte Orientale (UPO, Novara, Italy).

Στην παρούσα διπλωματική μελετήθηκαν τα ημι-πολικά κλάσματα UPO131 b και UPO155 b, από τα φύλλα και τη ρητίνη του μαστιχόδεντρου, αντίστοιχα, τα οποία διαλυτοποιήθηκαν σε DMSO και αποθηκεύτηκαν στους -20°C.

### 2.2.3. ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

- **Ammoniumpersulfate (APS) 10 %:** Διαλύονται 100mg APS σε 1ml ddH<sub>2</sub>O και αποθηκεύεται στους -20°C.
- **Dexamethazone (DEX):** Αποθηκεύεται στους -20°C διαλυμένη σε 100% αιθανόλη.
- **DTT 1M:** Σε 10ml ddH<sub>2</sub>O διαλύονται 1,54 gr DTT κι έπειτα αναδεύεται και αποθηκεύεται στους -20°C
- **PMSF 200mM:** 0.07gr PMSF διαλύονται σε 2ml ισοπροπανόλης και έπειτα αποθηκεύεται στους -20°C.
- **Sample Buffer 4x:** Αποτελείται από 1M Tris pH 6.8, 10% γλυκερόλη, 10% SDS, 5% μερκαπτοαιθανόλη, 1% κυανού της βρωμοφαινόλης και αποθηκεύεται στους -20°C.
- **Tris 20mM pH 7.5:** Για τη δημιουργία του αναμειγνύονται 20ml stock διαλύματος Tris 1M pH 7.5 (4 °C) με 980μl ddH<sub>2</sub>O και το διάλυμα διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.
- **Tris-HCl 1.5 M pH 8.8:** Για την παρασκευή 0.2 lt διαλύματος ζυγίζονται 36,342 gr Tris τα οποία διαλύονται σε dH<sub>2</sub>O. Το pH ρυθμίζεται στο 8.8 με προσθήκη HCl 12N και συμπληρώνεται ο όγκος με dH<sub>2</sub>O. Το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4°C.
- **Διάλυμα λύσης κυττάρων με χρήση υπερήχων (LysisBuffer):** Τα συστατικά του είναι 20mM Tris pH 7.5, 0.5% Triton X-100, 250mM NaCl και 3mM EDTA και αποθηκεύεται στους 4°C. Σε 1ml από το παραπάνω διάλυμα προστίθενται επιπλέον 0.5μl PMSF 20mM (-20°C), 2μl DTT 1M (-20°C) και 10μl μείγματος αναστολέων πρωτεασών.
- **Διαλύματα για εμφάνιση σήματος:** Παρασκευάζονται με ανάμειξη 1:3,5 v/v από το αντίστοιχο διάλυμα (fixer ή developer) σε dH<sub>2</sub>O και διατηρούνται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου.
- **Ρυθμιστικό διάλυμα Tris (TBS) 10x:** Για τη δημιουργία 1lt TBS 10X ζυγίζονται 24gr Tris-base (MB 121,1) και 88gr NaCl (MB 58,4). Έπειτα ρυθμίζεται το pH στα 7,4-7,6 με προσθήκη πυκνού HCl 12 M.
- **Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς (Transfer Buffer) 10x:** Αποτελείται από 10% Running Buffer 10x, 20% MeOH και 0.05% SDS. Ο όγκος συμπληρώνεται με προσθήκη dH<sub>2</sub>O και το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4 °C.

- **Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer) 10x:** Ζυγίζονται 30,3 gr Tris base και 144.00 g γλυκίνης, τα οποία διαλύονται σε όγκο 1lt ddH<sub>2</sub>O. Δεν ρυθμίζεται το pH του διαλύματος και αποθηκεύεται σε R.T.
- **Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer) 1x:** Για να το παρασκευάσουμε αραιώνουμε 100ml R.B. 10x σε 900ml dH<sub>2</sub>O (αναλογία 1:9). Στο διάλυμα προστίθεται και 10ml SDS . Διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.
- **Ρυθμιστικό διάλυμα TBS-T 1x:** Αποτελείται από 10% stock buffer TBS 10x και 1% Tween-20. Ο όγκος συμπληρώνεται με dH<sub>2</sub>O και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου.

#### 2.2.4. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ

- Dulbecco's modified eagle medium DMEM Gibco® 4,5 g/mol Glucose (Life Technologies - Invitrogen) [+] L-glutamate, [+] pyruvate, εμπλουτισμένο με 10% FBS, 1% L-γλουταμίνη και 1% Pen Strep (Πενικιλίνη/Στρεπταμυκίνη)
- Dulbecco's modified eagle medium DMEM Gibco® 4,5 g/mol Glucose (Life Technologies - Invitrogen) [-] L-glutamate, [-] phenol red, εμπλουτισμένο με 10% FBS cis (χωρίς στεροειδείς ορμόνες), 1% L-γλουταμίνη και 1% Pen Strep (Πενικιλίνη/Στρεπταμυκίνη)

#### 2.2.5 ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ

Στην παρούσα έρευνα χρησιμοποιήθηκαν οι κυτταρικές σειρές Hek293 (human embryonic kidney) και HeLa (human cervix adenocarcinoma), οι οποίες είναι μερικές από τις κυτταρικές σειρές που υπερεκφράζουν τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών..

#### 2.2.6. ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν διαλυμένα σε TBST με 2% γάλα και διατηρούνταν στους -20°C.

Πρωτογενή

- Anti-β-actin (Sigma), 1:4000
- Anti-GR 3932(Santa cruz), 1:1000

- Anti-procaspase 3 (Abcam), 1:4000
- Anti-PEPCK (Santa cruz), 1:2500
- Anti-Bcl-2 (Cell Signaling), 1:1000
- Anti-GADPH G-9 (Santa Cruz), 1:1000
- Anti -p65 (Santa Cruz), 1:1000

#### Δευτερογενή

- Mouse-HRP (Pierce), 1:50.000
- Rabbit-HRP (Pierce), 1:50.000

## 2.3. ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.3.1. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Πρώτο στάδιο του πειράματος μας είναι η καλλιέργεια των κυττάρων η οποία πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 37°C και 5% CO<sub>2</sub> σε θρεπτικό μέσο DMEM με phenol red με 4,5mg/ml γλυκόζη εμπλουτισμένο με 10% FBS (Fetal Bovine Serum), 1% Pen Strep και 1% L-γλουταμίνη σε T25 και T75 φλάσκες στον επωαστήρα. Για τη διαδικασία του παγώματος των κυττάρων, αφαιρέσαμε το προηγούμενο θρεπτικό και προσθέσαμε FBS και DMSO σε αναλογία 9:1 σε cryovials και αποθηκεύτηκαν στους -80°C. Για το στρώσιμο των κυττάρων, αφού προηγουμένως μετρηθήκαν σε πλακίδιο Neubauer, χρησιμοποιήθηκε DMEM χωρίς phenol red εμπλουτισμένο με 10% FBS cis από το οποίο απουσίαζαν τα στεροειδή καθώς και 1% L-γλουταμίνη και 1% Pen Strep.

### 2.3.2. ΛΥΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Πραγματοποιήθηκε λύση του κυτταρικού ιζήματος με προσθήκη lysis buffer και επώαση των κυττάρων για 20 με 25 λεπτά στον πάγο. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε λύση με υπερήχους (sonication), με ένταση 40% επαναλαμβάνοντας 5 κύκλους έκθεσης ενός δευτερόλεπτου με 35 sec μεσοδιάστημα.

### 2.3.3. ΜΕΘΟΔΟΣ BRADFORD

Βασίζεται στην αλλαγή χρώματος της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-25, η οποία υπό όξινες συνθήκες μπορεί από την καφεκόκκινη να μετατραπεί στη μπλε μορφή της αφού προσδεθούν σε αυτή πρωτεΐνες που περιέχονται στο υπό εξέταση διάλυμα. Το διάλυμα Bradford αραιώθηκε από το 5X (stock) στο 1 X και χρησιμοποιήθηκε σε τελική αραιώση 1:1000, δηλαδή 1  $\mu$ l πρωτεϊνικού εκχυλίσματος σε 1 ml αντιδραστηρίου 1X. Αφού τα δείγματα αφέθηκαν για 20 λεπτά στο σκοτάδι έπειτα, φωτομετρήθηκαν στα 595nm. Με τη μέθοδο Bradford μπορούμε να υπολογίζουμε το συνολικό πρωτεϊνικό περιεχόμενο που περιέχεται στο δείγμα μέσα από τον τύπο  $y=0,0345x+0,01$ , που προέκυψε μετά από κατασκευή πρότυπης καμπύλης με BSA.

#### 2.3.4. SDS-PAGE

Μετά τον υπολογισμό του ολικού κυτταρικού πρωτεϊνικού περιεχομένου με τη μέθοδο Bradford, τα κυτταρικά εκχυλίσματα διαλυτοποιήθηκαν σε Tris 20 mM και sample buffer 4X. Έπειτα, ηλεκτροφορήθηκαν, αφού πρώτα θερμανθήκαν στους 95°C για 3-5 λεπτά σε πηκτή ακρυλαμιδίου 10%.. Τα συστατικά των gel διαχωρισμού (separating) και προσκόλλησης (stacking) είναι τα εξής :

Separating gel		Stacking gel	
	10%		4%
ddH <sub>2</sub> O	2,425 ml	ddH <sub>2</sub> O	2,025 ml
Tris HCl pH=8.8 1.5M	1,25 ml	Tris HCl pH=6.8	0.21 ml
SDS 10%	50 $\mu$ l	SDS 10%	25 $\mu$ l
Bis/Acr 40%	1,25 ml	Bis/Acr 40%	0.25 ml
APS 10%	25 $\mu$ l	APS 10%	12,5 $\mu$ l
Temed	2,5 $\mu$ l	Temed	2,5 $\mu$ l

### **2.3.5. ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΤΗΣ WESTERN**

Αφού ολοκληρώθηκε η ηλεκτροφόρηση ακολούθησε η μεταφορά των δειγμάτων σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης 0,2  $\mu\text{M}$  διαμέτρου πόρων, διαδικασία που πραγματοποιείται υπό την επίδραση ηλεκτρομαγνητικής τάσης 0,35 A για 70 λεπτά σε πάγο, σε διάλυμα transfer buffer. Στη συνέχεια αφού ολοκληρωθεί η μεταφορά ακολουθεί επώαση της μεμβράνης με διάλυμα 10% w/v αποβουτυρωμένου γάλακτος σκόνης σε TBST 1X, υπό ανάδευση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η επώαση την μεμβράνης με το πρωτογενές αντίσωμα υπό ανάδευση στους 4°C για overnight. Ακολούθως έγιναν 5 πλύσεις των 5 λεπτών υπό ανάδευση με TBST 1X. Έπειτα, ακολούθησε η επώαση την μεμβράνης με το δευτερογενές αντίσωμα για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου 3 πλύσεις των 5 λεπτών με TBST 1X υπό ανάδευση. Ακολούθως, έγινε προσθήκη του υποστρώματος ECL A+B σε ίση αναλογία, αφού πρώτα αφέθηκε στο σκοτάδι για 3 λεπτά. Τέλος, πραγματοποιήθηκε έκθεση της μεμβράνης σε φιλμ σε ειδική κασετίνα στον σκοτεινό θάλαμο, και μονιμοποίηση του φιλμ στα διαλύματα developer και fixer για περίπου 1 λεπτό στο καθένα.

### **2.3.6. ΕΠΕΞΑΡΓΑΣΙΑ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΚΑΙ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ**

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση των ζωνών από τα φιλμ της ανοσοαποτύπωσης κατά Western με το πρόγραμμα ImageJ, αφού προηγουμένως τα σκανάραμε σε κλίμακα του γκρι (grayscale) στα 300dpi και τα αποθηκεύσαμε σε αρχείο TIFF. Έπειτα, χρησιμοποιήθηκε το Photoshop CS4 για την δημιουργία των τελικών εικόνων και τέλος η ανάλυση και η επεξεργασία των τιμών των ζωνών πραγματοποιήθηκε με το υπολογιστικό πρόγραμμα Excel.

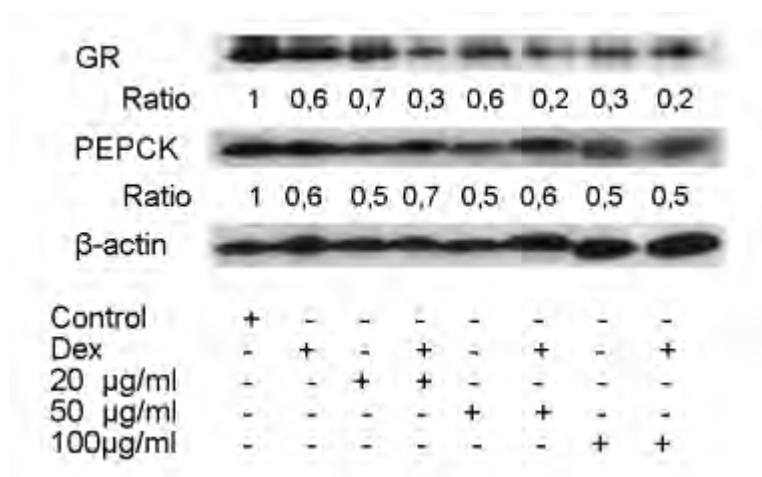
## **3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

### **3.1 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΡΑΣΕΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΤΑ ΦΥΛΛΑ ΤΟΥ ΜΑΣΤΙΧΟΔΕΝΤΡΟΥ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ HEK293**

#### **3.1.1 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΤΑ ΦΥΛΛΑ ΤΟΥ ΜΑΣΤΙΧΟΔΕΝΤΡΟΥ ΣΤΙΣ ΓΛΥΚΟΝΕΟΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ GR.**

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση της επίδρασης του ημι-πολικού κλάσματος από τα φύλλα του μαστιχοδέντρου σε κύτταρα Hek293, στα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR) και της καρβοξυκινάσης του

φωσφοενολοπυροσταφυλικού (PEPCK), ενός γλυκονεογενετικού ενζύμου και γονιδίου στόχου του GR, προκειμένου να διερευνηθεί κατά πόσο επηρεάζει τις γλυκονεογενετικές δράσεις του GR. Εφαρμόζοντας τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης κατά Western πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση των επιπέδων του GR και της PEPCK παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων του ημι-πολικού κλάσματος των φύλλων του μαστιχόδεντρου, με ή χωρίς δεξαμεθαζόνη (Dex) 10nM. Η κανονικοποίηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της PEPCK και του GR πραγματοποιήθηκε ως προς τα πρωτεϊνικά επίπεδα της β-ακτίνης.



**Σχήμα 1**

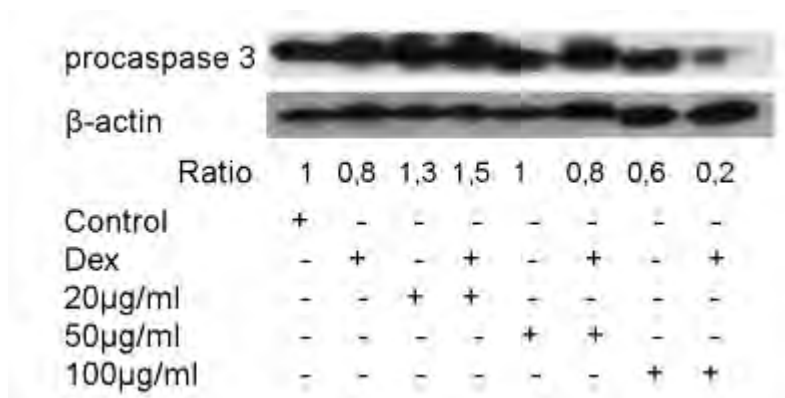
**Σχήμα 1: Προσδιορισμός της επίδρασης εκχυλίσματος από τα φύλλα του μαστιχόδεντρου στα πρωτεϊνικά επίπεδα του GR και της PEPCK με ανάλυση ανοσοαποτύπωσης κατά Western.**

Κύτταρα Hek293 αναπτύχθηκαν σε 6-well plates (150.000 cells/well), για 2 μέρες σε καλλιεργητικό μέσο, απουσία στεροειδών ορμονών. Στην συνέχεια έγινε προσθήκη του εκχυλίσματος και τα κύτταρα επώαστηκαν για 3 επιπλέον ημέρες παρουσία και απουσία δεξαμεθαζόνης και την 5<sup>η</sup> μέρα πραγματοποιήθηκε η συλλογή τους(harvest). Στο σχήμα 1 απεικονίζονται οι πρωτεϊνικές ζώνες του GR , PEPCK και της β-ακτίνης. Στα διαγράμματα που ακολουθούν παρουσιάζονται τα σχετικά πρωτεϊνικά επίπεδα των παραπάνω μορίων μετά από την κανονικοποίηση με την β-ακτίνη.(1,2)

Όσο αφορά τον GR, παρατηρήθηκε μείωση των πρωτεϊνικών του επιπέδων παρουσία αυξανόμενης συγκέντρωσης του εκχυλίσματος (από 20-70%), συγκριτικά με τα κύτταρα control, μία δράση που ενισχύθηκε ακόμη περισσότερο παρουσία και δεξαμεθαζόνης.

Μείωση των επιπέδων GR παρατηρείται και παρουσία 10nM DEX, σε συμφωνία με προηγούμενες παρατηρήσεις του εργαστηρίου μας, καθώς και άλλων ερευνητικών ομάδων (Georgatza et al., 2016). Συγχορήγησή ουσιών με DEX, αυξάνει την κατασταλτική δράση της DEX. Όσο αφορά την PEPCK επίσης παρατηρείται μείωση κατά 40%-50% των πρωτεϊνικών επιπέδων της με την προσθήκη του εκχυλίσματος σε σχέση με κύτταρα αναφοράς, χωρίς όμως να υπάρχουν αξιοσημείωτες διαφορές κατά τη συγχορήγησή τους με Dex.

### 3.1.2 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΤΗΣ ΠΡΟ-ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΤΑ ΦΥΛΛΑ ΤΟΥ ΜΑΣΤΙΧΟΔΕΝΤΡΟΥ



Σχήμα 2

**Σχήμα 2: Διερεύνηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της προκασπάσης-3, παρουσία εκχυλίσματος από τα φύλλα του μαστιχόδεντρου, με ανάλυση ανοσοαποτύπωσης κατά Western.**

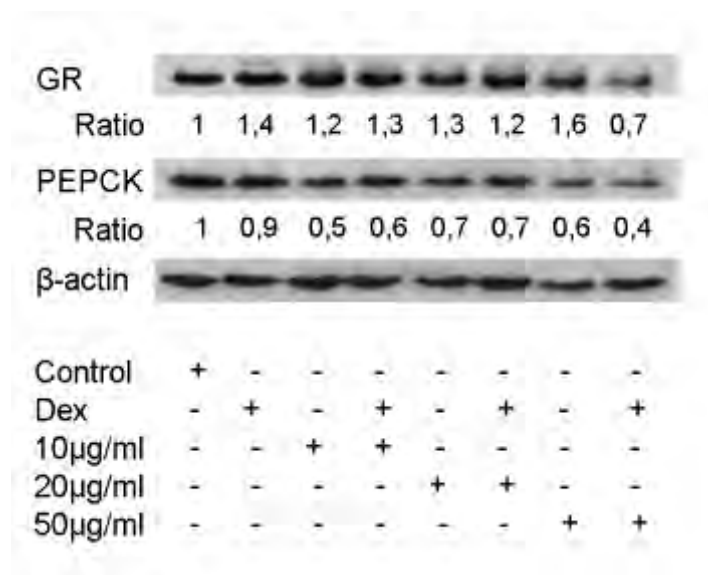
Όσο αφορά τα πρωτεϊνικά επίπεδα της προκασπάσης 3 παρατηρήθηκε μία σταδιακή μείωση παρουσία αυξανόμενης συγκέντρωσης του εκχυλίσματος από τα φύλλα του μαστιχόδεντρου, δράση που ενισχύθηκε ακόμη περισσότερο παρουσία δεξαμεθαζόνης.

## 3.2 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΡΑΣΕΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΤΑ ΦΥΛΛΑ ΤΟΥ ΜΑΣΤΙΧΟΔΕΝΤΡΟΥ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ HeLa

### 3.2.1 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΤΑ ΦΥΛΛΑ ΤΟΥ ΜΑΣΤΙΧΟΔΕΝΤΡΟΥ ΣΤΙΣ ΓΛΥΚΟΝΕΟΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ GR

Στη συνέχεια, προχωρήσαμε σε αξιολόγηση της επίδρασης του ημι-πολικού κλάσματος των φύλλων του μαστιχόδεντρου, στα πρωτεϊνικά επίπεδα του GR και της PEPCK, αλλά σε κύτταρα HeLa αυτή τη φορά.





**Σχήμα 3:**

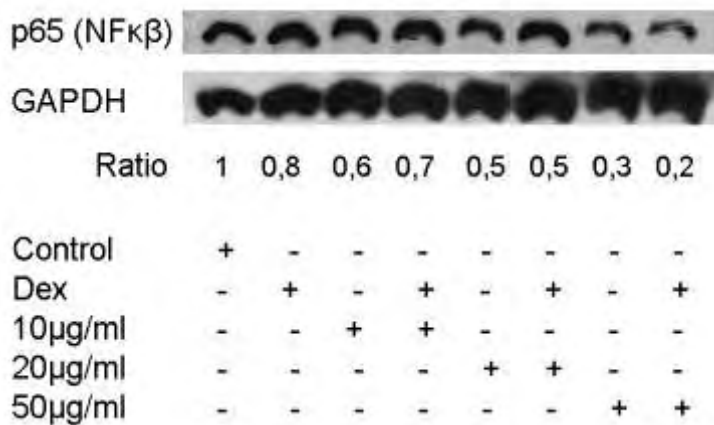
### **Προσδιορισμός της επίδρασης εκχυλίσματος από τα φύλλα του μαστιχόδεντρου στα πρωτεϊνικά επίπεδα του GR και PEPCK σε κύτταρα HeLa.**

Κύτταρα HeLa αναπτύχθηκαν σε 6-well plates (120.000 cells/well) σε θρεπτικό μέσο απουσία στεροειδών ορμονών για 48 ώρες. Μετά το πέρας αυτών έγινε προσθήκη αυξανόμενων συγκεντρώσεων του ημι-πολικού κλάσματος από τα φύλλα του μαστιχόδεντρου για άλλες 48 ώρες, ενώ 24 ώρες πριν τη συλλογή τους έγινε προσθήκη δεξαμεθαζόνης 10nM. Στο σχήμα 3 απεικονίζονται οι ζώνες των πρωτεϊνικών επιπέδων της PEPCK, του GR και της β-ακτίνης. Στα διαγράμματα παρουσιάζονται στα σχετικά πρωτεϊνικά επίπεδα των παραπάνω μορίων μετά την κανονικοποίησή τους με την β-ακτίνη (3,4)

Όσο αφορά τα πρωτεϊνικά επίπεδα του GR, εδώ, σε αντίθεση με τα κύτταρα Hek293 παρατηρήθηκε αύξηση, από 20-60%, σε σχέση με τα κύτταρα control, εκτός από τη συγκέντρωση των 50μg/ml με Dex, όπου παρατηρήθηκε μείωση. Όσο αφορά το γλυκονογενετικό ένζυμο PEPCK σημειώθηκε μείωση των πρωτεϊνικών του επιπέδων με την προσθήκη ημι-πολικού κλάσματος από τα φύλλα του μαστιχόδεντρου, με πιο έντονη μείωση στη συγκέντρωση των 50μg/ml με Dex. Ωστόσο, η συγκεκριμένη μελέτη χρήζει επανάληψης για επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων.

### **3.2.2. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΦΛΕΜΟΝΩΔΟΥΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΤΑ ΦΥΛΛΑ ΤΟΥ ΜΑΣΤΙΧΟΔΕΝΤΡΟΥ**

Έπειτα, θελήσαμε να μελετήσουμε την επίδραση εκχυλίσματος από τα φύλλα του μαστιχόδεντρου στη φλεγμονή, μέσω αξιολόγησης των πρωτεϊνικών επιπέδων της p65. Η p65 αποτελεί μια από τις ενεργές υπομονάδες του μεταγραφικού παράγοντα της ανοσοαπόκρισης NFκβ, που αποτελεί στόχο για θεραπεία χρόνιων φλεγμονωδών νόσων (Giridharan & Srinivasan, 2018)



**Σχήμα 4:**

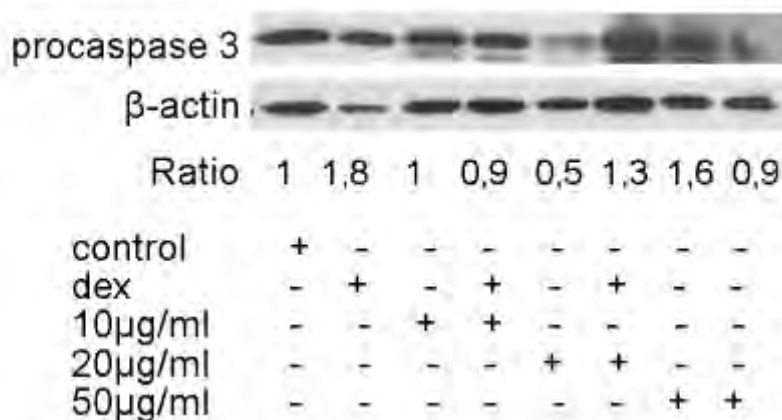
### **ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΦΥΛΛΩΝ ΤΟΥ ΜΑΣΤΙΧΟΔΕΝΤΡΟΥ ΣΤΑ ΠΡΩΤΕΙΝΙΚΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΤΗΣ P65 ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ HeLa**

Κύτταρα HeLa αναπτύχθηκαν σε 6-well plates (120.000 cells/well) σε θρεπτικό μέσο απουσία στεροειδών ορμονών για 48 ώρες. Μετά το πέρας αυτών έγινε προσθήκη αυξανόμενων συγκεντρώσεων του ημι-πολικού κλάσματος από τα φύλλα του μαστιχόδεντρου για άλλες 48 ώρες, ενώ 24 ώρες πριν τη συλλογή τους έγινε προσθήκη δεξαμεθαζόνης 10nM

Στο σχήμα 4 απεικονίζονται οι πρωτεϊνικές ζώνες της p65 και της (GAPDH) αφυδρογονάση της φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης). Στο διάγραμμα 6 παρουσιάζονται τα σχετικά πρωτεϊνικά επίπεδα της p65 μετά από κανονικοποίηση με το μόριο GAPDH.

Εδώ παρατηρήθηκε σταδιακή μείωση των επιπέδων της p65 (έως και 60%) όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του εκχυλίσματος από τα φύλλα του μαστιχόδεντρου, χωρίς να επηρεάζει σημαντικά η παρουσία της δεξαμεθαζόνης, επιβεβαιώνοντας την αντιφλεγμονώδη του δράση.

### **3.2.3 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΤΗΣ ΠΡΟ-ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΤΑ ΦΥΛΛΑ ΤΟΥ ΜΑΣΤΙΧΟΔΕΝΤΡΟΥ**



**Σχήμα 5:**

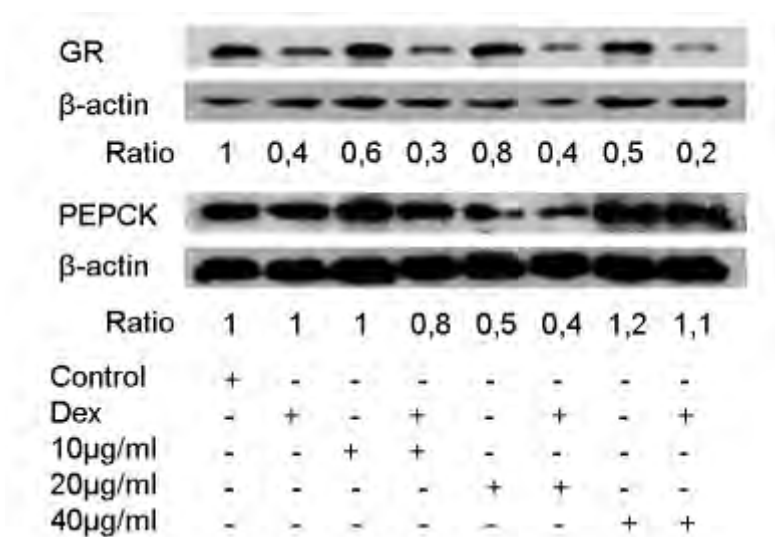
### Σχήμα 5: Απεικόνιση των πρωτεϊνικών επιπέδων της προκασπάσης-3 και της β-ακτίνης

Παρατηρούμε μια διαφορετική κατανομή σε σχέση με τα Hek293 κύτταρα. Φαίνεται μια αύξηση σε σχέση με τα κύτταρα control ιδιαίτερα παρουσία 20μg/ml+Dex και 50μg/ml συγκέντρωσης εκχυλίσματος. Δεδομένου ότι τα επίπεδα ανενεργής κασπάσης εμφανίζονται μειωμένα στις συνθήκες αναφοράς σε σχέση με τις υπόλοιπες, κάτι το οποίο δεν ήταν αναμενόμενο, τα αποτελέσματα αυτά χρήζουν επιβεβαίωσης.

### 3.3 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΩΝ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΡΑΣΕΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΤΗ ΜΑΣΤΙΧΑ ΧΙΟΥ (ΡΗΤΙΝΗ) ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ HEK293

#### 3.3.1. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΤΗ ΜΑΣΤΙΧΑ ΧΙΟΥ ΣΤΙΣ ΓΛΥΚΟΝΕΟΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ GR.

Στο τελευταίο στάδιο της έρευνάς μας πραγματοποιήσαμε αξιολόγηση των βιολογικών δράσεων του ημι-πολικού κλάσματος από τη ρητίνη του μαστιχόδεντρου, Μαστίχα Χίου, σε κύτταρα Hek293. Αρχικά, διερευνήθηκε η επίδρασή του στα πρωτεϊνικά επίπεδα της PECK και του GR, μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western, παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων σε συνδυασμό ή όχι, με δεξαμεθαζόνη.



Σχήμα 6:

**Προσδιορισμός της επίδρασης εκχυλίσματος από τη Μαστίχα Χίου στα πρωτεϊνικά επίπεδα του GR και PEPCK σε κύτταρα Hek293.**

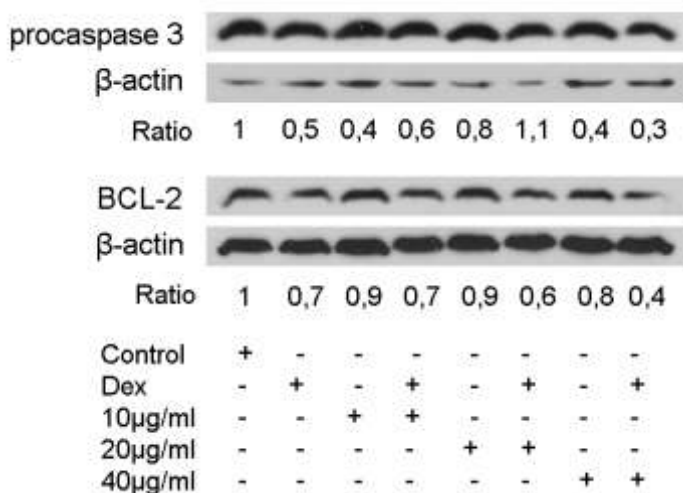
Κύτταρα Hek293 αναπτύχθηκαν σε 6-well plates (200.000 cells/well). σε θρεπτικό μέσο απουσία στεροειδών ορμονών για 48 ώρες. Μετά το πέρας αυτών έγινε η προσθήκη αυξανόμενων συγκεντρώσεων του εκχυλίσματος, καθώς και δεξαμεθαζόνης 10nM για 24 ώρες και έπειτα ακολούθησε η συλλογή τους (harvest). Στο σχήμα 6 απεικονίζονται τα πρωτεϊνικά επίπεδα του GR και της PEPCK και της β-ακτίνης.

Όσο αφορά τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών παρατηρήθηκε και εδώ μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του (έως και 40%) παρουσία αυξανόμενης συγκέντρωσης του εκχυλίσματος. Η δράση αυτή ενισχύεται έως και 80% παρουσία δεξαμεθαζόνης (μείωση), σε σχέση με τα κύτταρα control.

Όσο αφορά τα πρωτεϊνικά επίπεδα της καρβοξυκινάσης του φωσφοενολοπυροσταφυλικού (PEPCK) δεν σημειώνεται κάποια αξιόλογη μεταβολή, στη συγκέντρωση των 10μg/ml και 40 μg/ml, σε σχέση με τα πρωτεϊνικά επίπεδα στην συνθήκη αναφοράς. Υπό την επίδραση 20 μg/ml εκχυλίσματος (παρουσία και απουσία δεξαμεθαζόνης) τα πρωτεϊνικά επίπεδα της PEPCK μειώνονται σε σχέση με αυτά στα κύτταρα αναφοράς, κάτι που χρήζει περεταίρω διερεύνηση.

### 3.3.2 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΠΡΟ ΚΑΙ ΑΝΤΙ ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΜΑΣΤΙΧΑΣ ΧΙΟΥ

Τέλος, έγινε προσπάθεια μελέτης της προ-αποπτωτική και αντιαποπτωτική δράση του εκχυλίσματος της Μαστίχας Χίου μέσω διερεύνησης των πρωτεϊνικών επιπέδων του προ-αποπτωτικού μορίου προ-κασπάση-3 και του αντί-αποπτωτικού μορίου Bcl-2



Σχήμα 7 :

### **Σχήμα 7: Προσδιορισμός της επίδρασης εκχυλίσματος από τη Μαστίχα Χίου στα πρωτεϊνικά επίπεδα του procaspase-3 και Bcl-2 σε κύτταρα Hek293.**

Κύτταρα Hek293 αναπτύχθηκαν σε 6-well plates (200.000 cells/well). σε θρεπτικό μέσο απουσία στεροειδών ορμονών για 48 ώρες. Μετά το πέρας αυτών έγινε η προσθήκη αυξανόμενων συγκεντρώσεων του εκχυλίσματος, καθώς και δεξαμεθαζόνης 10nM για 24 ώρες και έπειτα ακολούθησε η συλλογή τους (harvest).

Στο σχήμα 7 απεικονίζονται οι ζώνες από τα πρωτεϊνικά επίπεδα των BCL-2, pro-caspase-3 και β-ακτίνης.

Όσο αφορά τα πρωτεϊνικά επίπεδα της προ-κασπάσης -3, παρατηρείται μείωση έως και 60% (με εξαίρεση τη συνθήκη 20μg/ml με Dex), που πιθανόν οφείλεται σε πειραματικό σφάλμα), παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων εκχυλίσματος Μαστίχας Χίου, με τη μεγαλύτερη μείωση να παρατηρείται στα 40μg/ml.

Όσο αφορά την αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη BCL-2, στο διάγραμμα 12, παρατηρείται μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων (έως και 40%) σε σχέση με τα κύτταρα control, παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων εκχυλίσματος Μαστίχας Χίου. Η δράση αυτή ενισχύεται κατά 10%-15% παρουσία δεξαμεθαζόνης.

## **4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

Τα τελευταία χρόνια έχουν πραγματοποιηθεί πλήθος ερευνών που αφορούν τις αξιοσημείωτες ευεργετικές δράσεις της Μαστίχας Χίου. Έχουν αποδειχθεί και τεκμηριωθεί πολλές και διαφορετικές δράσεις, όπως αντικαρκινικές, αντιδιαβητικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιοξειδωτικές καρδιοπροστατευτικές κ.α. σε in vivo και in vitro κλινικά δείγματα (Chios Mastiha published scientific booklet, Dimas et al. 2012, Min et al, 2008)

Το μεγαλύτερο μέρος του εκχυλίσματος της Μαστίχας Χίου το αντιπροσωπεύουν τα τριτερπένια στα οποία έχουν αποδοθεί τα οφέλη της και τα οποία επίσης ομοιάζουν δομικά με τα φυσικά γλυκοκορτικοειδή. Αυτό αποτέλεσε και την αφορμή για να πραγματοποιηθούν μελέτες για το αν μπορούν να αποτελέσουν τροποποιητές του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών. Σε μικρότερες συγκεντρώσεις έχουν εντοπιστεί και φυτοστερόλες, πολυφαινολικά μόρια, φυσικά πολυμερή και πολλά άλλα (Chios Mastiha published scientific booklet,; Georgiadis et al., 2014Georgatza et al., 2016).

Τα γλυκοκορτικοειδή ανήκουν στην ομάδα λιποειδικών στεροειδών ορμονών που έχουν την ικανότητα να διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη με απλή διάχυση, να προσδένονται στον υποδοχέα τους και να τον ενεργοποιούν. Ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών (GR) ανήκει στην υπεροικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων και λειτουργεί ως προσδετό-εξαρτώμενος μεταγραφικός παράγοντας, που ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων που αποκρίνονται σε γλυκοκορτικοειδή. (Nicolaidis et al., 2010) Τα συνθετικά γλυκοκορτικοειδή χορηγούνται για τη θεραπεία των χρόνιων φλεγμονωδών νόσων, αλλά δυστυχώς αποτελούν ευχή και κατάρρα αφού μαζί με τις θεραπευτικές δράσεις φέρουν μαζί τους και σοβαρές παρενέργειες όπως οστεοπόρωση, υπεργλυκαιμία, προβλήματα στη όραση κ.α. Γι αυτό και κρίθηκε η ανάγκη για την ανάπτυξη νέων γλυκοκορτικοειδών με τις λιγότερες δυνατές παρενέργειες. (Oakley & Cidlowski, 2013)

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη των βιολογικών δράσεων των εκχυλισμάτων από φύλλο και ρητίνη της Μαστίχας Χίου στις κυτταρικές σειρές Hek293 και HeLa. Επίσης, στόχος ήταν η διερεύνηση του κατά πόσο μπορούν να εμπλέκονται στην σηματοδότηση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, ώστε μελλοντικά να υπάρχει δυνατότητα αξιοποίησης τους ως αγωνιστές του υποδοχέα για την καταπολέμηση διαφόρων ασθενειών (καρκίνου, φλεγμονωδών) χωρίς ταυτόχρονα να επιφέρουν τις σοβαρές παρενέργειες της σηματοδότησης του GR.

Οι μελέτες μας πραγματοποιήθηκαν εφαρμόζοντας την ανάλυση ανοσοαποτύπωσης κατά Western χρησιμοποιώντας παράλληλα ως θετικό μάρτυρα το συνθετικό γλυκοκορτικοειδές, δεξαμεθαζόνη (Dex). Ξεκινήσαμε με την αξιολόγηση της επίδρασης του εκχυλίσματος από τα φύλλα του μαστιχόδεντρου στα επίπεδα του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR) και του γλυκονεογενετικού ενζύμου καρβοξυκινάσης του φωσφοενολοπυροσταφυλικού (PEPCK), που αποτελεί γονίδιο στόχο του GR, σε κύτταρα Hek293. Όσο αφορά τον GR παρατηρήθηκε μείωση των πρωτεϊνικών του επιπέδων παρουσία αυξανόμενης συγκέντρωσης του ημι-πολικού κλάσματος από τα φύλλα του μαστιχόδεντρου, συγκριτικά με τα κύτταρα αναφοράς, μία δράση που ενισχύθηκε ακόμη περισσότερο παρουσία δεξαμεθαζόνης. Όσο αφορά την PEPCK επίσης παρατηρήθηκε μείωση των πρωτεϊνικών της επιπέδων με την προσθήκη του εκχυλίσματος σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς χωρίς όμως να υπάρχουν αξιοσημείωτες διαφορές παρουσία ή απουσία της Dex. Επίσης, μελετήθηκε και η προ-αποπτωτική επίδραση του εκχυλίσματος αυτού στα κύτταρα Hek293 μέσω διερεύνησης των πρωτεϊνικών επιπέδων του προ-αποπτωτικού μορίου προ-κασπάση 3, όπου παρατηρήθηκε μία σταδιακή μείωση παρουσία αυξανόμενης συγκέντρωσης του εκχυλίσματος, ενώ με την παρουσία δεξαμεθαζόνης η δράση αυτή ενισχύεται .

Συνεχίσαμε τη μελέτη μας με το ίδιο εκχύλισμα από τα φύλλα του μαστιχόδεντρου αλλά αυτή τη φορά στη κυτταρική σειρά HeLa. Αρχικά, αξιολογήσαμε την επίδραση του ημι-πολικού κλάσματος των φύλλων του μαστιχόδεντρου, στα πρωτεϊνικά επίπεδα του GR

και της PEPCK. Όσο αφορά τα πρωτεϊνικά επίπεδα του GR, εδώ, σε αντίθεση με τα κύτταρα Hek293 παρατηρήθηκε αύξηση, από 20-60%, σε σχέση με τα κύτταρα control, εκτός από τη συγκέντρωση των 50μg/ml με Dex, όπου παρατηρήθηκε μείωση. Όσο αφορά το γλυκονογενετικό ένζυμο PEPCK σημειώθηκε μείωση των πρωτεϊνικών του επιπέδων με την προσθήκη ημι-πολικού κλάσματος, με πιο έντονη μείωση στη συγκέντρωση των 50μg/ml με Dex. Ωστόσο, η συγκεκριμένη μελέτη χρήζει επανάληψης για επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων, ώστε να αποσαφηνιστεί εάν οι διαφορές οφείλονται σε πειραματικό σφάλμα ή στον διαφορετικό κυτταρικό τύπο. Στη συνέχεια, θελήσαμε να μελετήσουμε την επίδραση του εκχυλίσματος στη φλεγμονή μέσω διερεύνησης των πρωτεϊνικών επιπέδων της p65, η οποία αποτελεί μια από τις ενεργές υπομονάδες του μεταγραφικού παράγοντα της ανοσοαπόκρισης NF-κβ, που αναφέρεται ευρέως ως στόχος για θεραπεία χρόνιων φλεγμονωδών νόσων (Giridharan & Srinivasan, 2018). Εδώ, παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων της p65, όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του εκχυλίσματος από τα φύλλα του μαστιχόδεντρου, γεγονός που αποτελεί στοιχείο αντιφλεγμονώδους δράσης. Τέλος, μελετήσαμε και την προ-αποπτωτική δράση του εκχυλίσματος στα HeLa και πάλι μέσω διερεύνησης των πρωτεϊνικών επιπέδων του προ-αποπτωτικού μορίου της προ-κασπάσης 3 όπου εδώ παρατηρήθηκαν διαφορές σε σχέση με τα Hek293 κύτταρα. Ειδικότερα, φαίνεται μια αύξηση σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς ιδιαίτερα σε συγκέντρωση 10μg/ml και 50μg/ml απουσίας ζ, κάτι που χρήζει περεταίρω διερεύνησης.

Στο τελευταίο κομμάτι της έρευνάς μας πραγματοποιήσαμε αξιολόγηση των βιολογικών δράσεων του ημι-πολικού κλάσματος από τη ρητίνη του μαστιχόδεντρου, Μαστίχα Χίου, σε κύτταρα Hek293. Και εδώ διερευνήθηκε, αρχικά, η επίδρασή του στα πρωτεϊνικά επίπεδα της PEPCK και του GR παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων, παρουσία και απουσία δεξαμεθαζόνης. Όσο αφορά τον GR παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων του παρουσία αυξανόμενης συγκέντρωσης του εκχυλίσματος. Η δράση αυτή ενισχύεται παρουσία δεξαμεθαζόνης, με την μείωση να φτάνει το 80% σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς. Όσο αφορά την PEPCK παρατηρήθηκε στα 20 μg/ml (παρουσία και απουσία δεξαμεθαζόνης) μείωση των πρωτεϊνικών της επιπέδων σε σχέση με την συνθήκη αναφοράς, ενώ στα 40 μg/ml παρατηρήθηκε αύξηση, κάτι που φαίνεται ότι απαιτεί περεταίρω διερεύνηση. Τέλος μελετήσαμε τη προ-αποπτωτική και αντιαποπτωτική δράση του εκχυλίσματος της Μαστίχας Χίου μέσω διερεύνησης των πρωτεϊνικών επιπέδων του προ-αποπτωτικού μορίου προ-κασπάση-3 και του αντί-αποπτωτικού μορίου Bcl-2. Όσο αφορά την προ-κασπάση -3, παρατηρήθηκε μείωση έως και 60% των πρωτεϊνικών επιπέδων της παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων εκχυλίσματος Μαστίχας Χίου. Όσο αφορά την αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη BCL-2, επίσης παρατηρήθηκε μείωση των πρωτεϊνικών της επιπέδων έως και 40% σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς, ενώ παρουσία της δεξαμεθαζόνης η δράση αυτή ενισχύεται κατά 10-15%.

Συμπερασματικά, από το σύνολο των αποτελεσμάτων προηγούμενων ερευνών και της παρούσας έρευνας καθίσταται σαφές ότι το εκχύλισμα, και συγκεκριμένα το ημι-πολικό κλάσμα, τόσο από τα φύλλα του μαστιχόδεντρου όσο και από την ίδια τη Μαστίχα Χίου παρουσιάζει μια αξιοσημείωτη επίδραση μειώνοντας τη μεταγραφική δραστικότητα του GR. Η δράση αυτή οδηγεί είτε σε διατήρηση, είτε σε μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της PEPCK, μην επεμβαίνοντας ή καταστέλλοντας την γλυκονεογενετική δράση του GR. Επιπλέον, αξιοσημείωτη είναι και η συμβολή του εκχυλίσματος στην καταστολή της φλεγμονής, μέσω μείωσης της μεταγραφικής δραστικότητας του παράγοντα φλεγμονής NF-κβ, που προέκυψε από προηγούμενες μελέτες, καθώς και των πρωτεϊνικών επιπέδων της p65 υπομονάδας του, που δείχθηκε στην παρούσα μελέτη. Επίσης, το εκχύλισμα από τα φύλλα και τη ρητίνη συμβάλλει και στην επαγωγή της απόπτωσης μέσω της μείωσης προ- και αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών. Ωστόσο, επιπλέον πειράματα πρέπει να πραγματοποιηθούν ακόμη ώστε να αξιολογηθούν οι βιολογικές δράσεις εκχυλισμάτων από τα φύλλα και τη ρητίνη του μαστιχόδεντρου, καθώς και να αποσαφηνιστούν πλήρως οι βιοχημικοί μηχανισμοί με τους οποίους δρουν, με απώτερο στόχο τη διερεύνηση της εμπλοκής τους στη σηματοδότηση του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών. Όλα αυτά, θα συμβάλλουν ώστε μελλοντικά η Μαστίχα Χίου να μπορεί να αξιοποιηθεί ως ένα εν δυνάμει αντικαρκινικό, αντιφλεγμονώδες και αντιδιαβητικό φάρμακο μέσω εκλεκτικής ενεργοποίησης του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, αλλά με τις λιγότερες δυνατές παρενέργειες της σηματοδότησής του.



## 5.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70–76. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Coutinho, A. E., & Chapman, K. E. (2011). The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. *Molecular and Cellular Endocrinology*.
- Dimas K, Pantazis P, Ramanujam R, (2012), "Chios Mastic Gum: A Plantproduced Resin Exhibiting Numerous Diverse Pharmaceutical and Biomedical Properties", *In vivo* 26: 777-786 <https://doi.org/10.1016/j.mce.2010.04.005>
- Georgatza, D., Gorgogietas, V. A., Kylindri, P., Charalambous, M. C., Papadopoulou, K. K., Hayes, J. M., & Psarra, A. M. G. (2016). The triterpene echinocystic acid and its 3-O-glucoside derivative are revealed as potent and selective glucocorticoid receptor agonists. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.08.028>
- Georgiadis I, Karatzas T, Korou LM, Katsilambros N, Perrea D, (2014), "Beneficial Health Effects of Chios Gum Mastic and Peroxisome ProliferatorActivated Receptors: Indications of Common Mechanisms", *Journal Of Medicinal Food*, J Med Food, 1–10
- Georgiadis, I., Karatzas, T., Korou, L. M., Agrogiannis, G., Vlachos, I. S., Pantopoulou, A., ... Perrea, D. N. (2014). Evaluation of chios mastic gum on lipid and glucose metabolism in diabetic mice. *Journal of Medicinal Food*. <https://doi.org/10.1089/jmf.2013.0069>
- Giridharan, S., & Srinivasan, M. (2018). Mechanisms of NF-κB p65 and strategies for therapeutic manipulation. *Journal of Inflammation Research*. <https://doi.org/10.2147/JIR.S140188>
- Gruver-Yates, A., & Cidlowski, J. (2013). Tissue-Specific Actions of Glucocorticoids on Apoptosis: A Double-Edged Sword. *Cells*. <https://doi.org/10.3390/cells2020202>
- Hintzpeter, J., Stapelfeld, C., Loerz, C., Martin, H. J., & Maser, E. (2014). Green tea and one of its constituents, epigallocatechine-3-gallate, are potent inhibitors of human 11β-hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084468>
- Kadmiel, M., & Cidlowski, J. A. (2013). Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. *Trends in Pharmacological Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2013.07.003>
- Loizou S, Paraschos S, Mitakou S, Chrousos GP, Lekakis I, Moutsatsou P, (2009)"Chios Mastic Gum Extract and Isolated Phytosterol Tirucallol Exhibit Anti-

Inflammatory Activity in Human Aortic Endothelial Cells”, *Experimental Biology and Medicine* 234: 553

- Magkouta S, Stathopoulos GT, Psallidas I, Papapetropoulos A, Kolisis FN, Roussos C, Loutrari H, (2009), “Protective Effects of Mastic Oil From *Pistacia Lentiscus* Variation Chia Against Experimental Growth of Lewis Lung Carcinoma”, *Nutrition and Cancer*, 61:5, 640-648
- Min J.H., Kim M.J., Kim I.R., Lee S.E., Kwak H.H., Kim G.C., Park H.R., Shin S.H., Kim C.H., Jeong N.Y., Suh H., Park B.S. [2008]: Apoptotic Effect of Co-Treatment with a Natural Product, Chios Gum Mastic, and a Synthetic Chenodeoxycholic Acid Derivative, HS1200, on Human Osteosarcoma Cells. *Cells. Korean J Phys Anthropol.* , 21 (2): 167-180.
- Nicolaides, N. C., Galata, Z., Kino, T., Chrousos, G. P., & Charmandari, E. (2010). The human glucocorticoid receptor: Molecular basis of biologic function. *Steroids*. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2009.09.002>
- Oakley, R. H., & Cidlowski, J. A. (2013). The biology of the glucocorticoid receptor: New signaling mechanisms in health and disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.09.007>
- Psarra, A. M. G., & Sekeris, C. E. (2008). Nuclear receptors and other nuclear transcription factors in mitochondria: Regulatory molecules in a new environment. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2007.10.021>
- Psarra AM, Sekeris C, (2009), “Glucocorticoid receptors and other nuclear transcription factors in mitochondria and possible functions”, *Biochimica et Biophysica Acta*, ELSEVIER, 1787:431-6
- Psarra AM, Sekeris C, (2011), “Glucocorticoids induce mitochondrial gene transcription in HepG2 cells: Role of the mitochondrial glucocorticoid receptor”, *Biochimica et Biophysica Acta*, ELSEVIER, 1813, 1814– 1821
- Scheschowitsch, K., Leite, J. A., & Assreuy, J. (2017). New insights in glucocorticoid receptor signaling-more than just a ligand-binding receptor. *Frontiers in Endocrinology*. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00016>
- Tzani, A., Bletsas, E., Doulamis, I. P., Korou, M. L., Konstantopoulos, P., Vlachos, I. S., ... Perrea, D. N. (2016). Hypolipidemic, hepatoprotective and anti-inflammatory role of Chios Mastic gum in Streptozotocin-induced diabetic mice with fatty liver disease. *Hellenic Atherosclerosis Society*, 7(4), 161–173.
- “Overview of the major scientific publications on the beneficial activity of Chios Mastiha”, (2018), Ένωση Μαστιχοπαραγωγών Χίου, Chios Mastiha published scientific booklet

